

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2002 年 7 月 25 日 (25.07.2002)

PCT

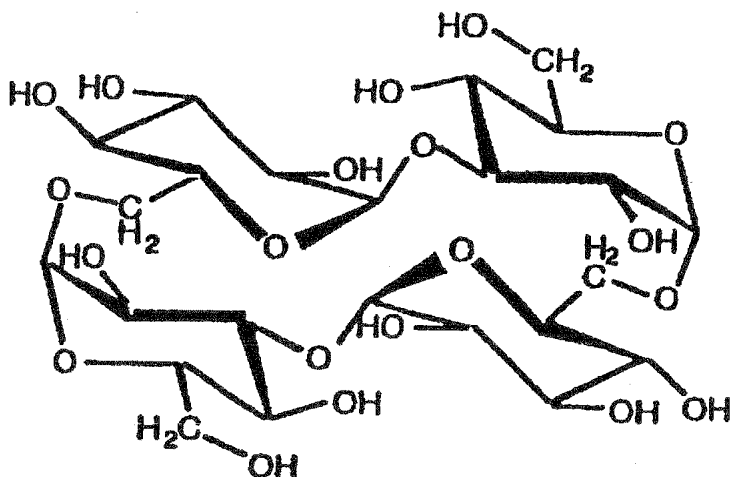
(10) 国際公開番号  
WO 02/057011 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: B01J 20/22, [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 Okayama (JP).  
A23L 3/42, C07H 3/06, A61K 47/26
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/00288 (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 久保田 倫夫 (KUBOTA, Michio) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP). 西本 友之 (NISHIMOTO, Tomoyuki) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP). 阿賀 創 (AGA, Hajime) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP). 福田 恵温 (FUKUDA, Shigeharu) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP). 三宅 俊雄 (MIYAKE, Toshio) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP).
- (22) 国際出願日: 2002 年 1 月 17 日 (17.01.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2001-10991 2001 年 1 月 19 日 (19.01.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社林原生物化学研究所 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO)

[続葉有]

(54) Title: DEHYDRATING AGENT AND METHOD FOR DEHYDRATING MOIST ARTICLE USING THE AGENT AND DEHYDRATED ARTICLE OBTAINED BY THE METHOD

(54) 発明の名称: 脱水剤及びそれを用いる含水物の脱水方法並びにその方法で得られる脱水物品



(57) Abstract: A dehydrating agent comprising a cyclic tetra-saccharide, which is defined in the specification, as an effective component; a method for dehydrating a moist article, characterized in that the moist article is incorporated into, is contacted with, or is caused to be present with a cyclic tetra-saccharide; and a dehydrated article obtained by the method. The cyclic tetra-saccharide is a non-reducing saccharide and therefore can be used for dehydrating an article with no deterioration of the quality of the article.

(57) 要約:

非還元性糖質の無水物を脱水剤とし、品質の劣化を起こすことなく、含水物を脱水することを課題とし、環状四糖を有効成分とする脱水剤及び含水物に環状四糖を含有、接触又は共存させることを特徴とする含水物の脱水方法、並びにその方法で得られる脱水物品を提供する。



(81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

## 明 細 書

脱水剤及びそれを用いる含水物の脱水方法並びにその方法で得られる脱水物品

5

## 技術分野

本発明は、サイクロ { $\rightarrow 6$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow$ ) の構造を  
10 有する糖質（当該糖質を、その構造にちなんで、本明細書では、以下、「環状四糖」と称する。）を有効成分とする脱水剤及びそれを用いる含水物の脱水方法並びにその方法で得られる脱水物品に関する。

## 背景技術

15 糖質を用いる脱水方法は、先に、本発明者等が、特開昭 62 - 136240 号公報、特開昭 62 - 152536 号公報、特開昭 62 - 152537 号公報、特開平 6 - 170221 号公報などで開示したように、無水糖質が、水分を捕捉して含水結晶に変換される途上に脱水力を発揮させる方法である。この方法は、加熱乾燥などとは違って、  
20 苛酷な条件を必要としないので、含水物を変質、劣化させることなく、脱水物品に変換する特徴を有している。

しかしながら、これら方法のうち、特開昭 62 - 152536 号公報で開示した、無水グルコース、無水ガラクトースなどの無水アルドヘキソースを用いる場合には、脱水量が比較的大きいものの還元性糖  
25 質であることから反応性に富み、アミノ酸、ペプチドなどと褐変反応を起こし易く、脱水物品の保存安定性に不安のあることが判明した。

また、無水アルドヘキソースは、比較的高湿度においても含水結晶に変換せず、脱水力の乏しいことが判明した。また特開昭 62-136240 号公報で開示した無水マルトースを用いる場合や、特開昭 62-152537 号公報で開示した無水パラチノースを用いる場合には、その還元力が弱いものの基本的には還元性糖質であり、脱水物品の長期安定性に、なお不安が残ることが判明した。その上、捕捉できる水分量がどちらの場合も糖質の約 5 w/w % と比較的少ないことから、脱水剤として多量の無水マルトースあるいは無水パラチノースを必要とする欠点のあることも判明した。

10 一方、特開昭 62-152537 号公報で開示した無水ラフィノース、無水エルロース、無水メレチトースなどの非還元性無水グリコシルフルクトシドは還元力を持たないためアミノ酸、ペプチドなどとの褐変反応もなく、長期保存安定性において優れていると考えられる。しかしながら、その分子内に耐酸性の小さいフルクトシド結合を持っていることから、酸性含水物の脱水剤としては、必ずしも適していないことが想定され、得られる脱水物品の安定性にも不安が残る。また、  
15 特開平 6-170221 号公報で開示した無水  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースは還元力を持たないので長期保存安定性に優れており、さらに捕捉できる水分量は糖質の約 10 w/w % と比較的多いことから脱水剤として上記の糖質よりも適しているといえる。しかしながら、依然として多量の無水  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースを必要としているため、さらに脱水及び／又は乾燥効率の高い脱水剤が求められている。

#### 発明の開示

25 本発明者等は、糖質を用いる脱水方法における欠点を解消することを目的として、天然型の非還元性糖質の無水物を検索し、更に優れた



脱水剤の確立とその利用について鋭意検討を続けてきた。

一方、本発明者等は、先に実験室レベルでの製造方法が知られていた環状四糖を工業レベルで澱粉質を原料として比較的安価に大量生産する方法を確立した。併せて、環状四糖には少なくとも含水形態としての5乃至6含水結晶及び1含水結晶、及び無水形態としての無水結晶及び無水非晶質の形態が存在することを明らかにし、その後の研究により、無水結晶、1含水結晶及び無水非晶質の環状四糖は水分を吸収し、含水形態である5乃至6含水結晶に容易に変換し得ることを発見した。

この特徴を脱水剤に利用すべくさらに研究を重ねたところ、上記した無水結晶、1含水結晶及び無水非晶質から選ばれる環状四糖は、優れた脱水能を有しており、加えて、得られる脱水物品が極めて安定であることから広範囲に適用でき、従来知られていた糖質よりも脱水剤として好適であることを見出した。即ち、脱水能を有する環状四糖、つまり無水結晶環状四糖、1含水結晶環状四糖及び無水非晶質環状四糖から選ばれる糖質を含水食品、含水医薬品などの含水物に含有、接触又は共存させて5乃至6含水結晶環状四糖に変換させることにより、環状四糖の結晶水として多量の水分を捕捉し、かつきわめて強力な脱水剤として作用すること、及び安定性に優れるため酸性含水物を含めて広範囲の含水物に適用できることを見出し、風味良好な高品質の脱水食品や、高活性で安定な脱水医薬品などの脱水物品を容易に製造し得ることを確認して、本発明を完成した。

したがって、本発明は、従来、脱水剤として全く注目されなかった環状四糖を選択したものであり、とりわけ脱水能を有する環状四糖を脱水剤として含有、接触又は共存させ、含水物を脱水する方法は、本発明をもって嚆矢とする。

## 図面の簡単な説明

第 1 図は、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素反応により得られた糖質を高速液体クロマトグラフィーにかけたときの溶出パターンを示す図である。

5 第 2 図は、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素反応により得られた環状四糖の核磁気共鳴スペクトル ( $^1\text{H-NMR}$  スペクトル) を示す図である。

第 3 図は、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素反応により得られた環状四糖の核磁気共鳴スペクトル ( $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトル) を示す図である。  
10

第 4 図は、環状四糖の構造が、サイクロ { $\rightarrow 6$ }- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ ) であることを示す図である。

15 第 5 図は、バチルス グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

第 6 図は、バチルス グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。  
20

第 7 図は、バチルス グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の温度安定性を示す図である。

第 8 図は、バチルス グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の pH 安定性を示す図である。

25 第 9 図は、バチルス グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

第 10 図は、バチルス グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

第 11 図は、バチルス グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の温度安定性を示す図である。

5 第 12 図は、バチルス グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の pH 安定性を示す図である。

第 13 図は、バチルス グロビスポルス C 11 由来の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

10 第 14 図は、バチルス グロビスポルス C 11 由来の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

第 15 図は、バチルス グロビスポルス C 11 由来の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の温度安定性を示す図である。

15 第 16 図は、バチルス グロビスポルス C 11 由来の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の pH 安定性を示す図である。

第 17 図は、バチルス グロビスポルス C 11 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

20 第 18 図は、バチルス グロビスポルス C 11 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

第 19 図は、バチルス グロビスポルス C 11 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の温度安定性を示す図である。

第 20 図は、バチルス グロビスポルス C 11 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の pH 安定性を示す図である。

25 第 21 図は、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素反応により得られた  $\alpha$ -イソマルトシルマルトトリオースの  $^1\text{H-NMR}$  スペクト

ルを示す図である。

第 2 2 図は、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素反応により得られた  $\alpha$ -イソマルトシルマルトテトラオースの  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを示す図である。

5 第 2 3 図は、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素反応により得られた  $\alpha$ -イソマルトシルマルトトリオースの  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルを示す図である。

第 2 4 図は、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素反応により得られた  $\alpha$ -イソマルトシルマルトテトラオースの  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルを示す図である。  
10

第 2 5 図は、5 乃至 6 含水結晶環状四糖の顕微鏡写真をディスプレイ上に表示した中間調画像である。

第 2 6 図は、5 乃至 6 含水結晶環状四糖状粉末を粉末 X 線回折法で解析したときの回折スペクトルを示す図である。

15 第 2 7 図は、5 乃至 6 含水結晶環状四糖状粉末を熱重量測定したときの熱重量曲線を示す図である。

第 2 8 図は、本発明の 1 含水結晶環状四糖粉末を粉末 X 線回折法で解析したときの回折スペクトルを示す図である。

第 2 9 図は、本発明の 1 含水結晶環状四糖粉末を熱重量測定したとき  
20 の熱重量曲線を示す図である。

第 3 0 図は、5 乃至 6 含水結晶環状四糖粉末を  $40^\circ\text{C}$  で真空乾燥して得られる無水結晶環状四糖粉末を粉末 X 線回折法で解析したときの回折スペクトルを示す図である。

第 3 1 図は、5 乃至 6 含水結晶環状四糖粉末を  $120^\circ\text{C}$  で真空乾燥  
25 して得られる無水結晶環状四糖粉末を粉末 X 線回折法で解析したときの回折スペクトルを示す図である。

第 3 2 図は、本発明の無水結晶環状四糖粉末を熱重量測定したときの熱重量曲線を示す図である。

第 3 3 図は、環状四糖水溶液を凍結乾燥及び真空乾燥して得られる無水非晶質環状四糖粉末を粉末 X 線回折法で解析したときの回折スペクトルを示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明における含水物の脱水方法は、水分を含有しているもの、とりわけ、結晶水のような結合水分とは違った遊離水分を含有しているものの脱水方法として好ましく、例えば、本発明の脱水剤を乾燥食品などを封入した防湿容器内に共存させることで、雰囲気に含まれる水分を低減する場合、更には、例えば、食品、医薬品、化粧品、工業化学品、これらの原材料又は加工中間物など各種含水物に含有若しくは接触させることで、含水物の遊離水分を低減させる場合などに有利に適用できる。

これら含水物に脱水能を有する環状四糖を含有、接触又は共存させると、脱水能を有する環状四糖は、その重量の約 1.1 乃至 1.5 w/w % (以下、本明細書では、特にことわらない限り、「w/w %」を単に「%」と略記する。)もの水分を 5 乃至 6 含水結晶環状四糖の結晶水として含水物から強力に取り込み(この値は無水マルトースの場合の 2.2 乃至 3 倍量、若しくは無水  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースの場合の 1.1 乃至 1.5 倍量に相当する。)、含水物の水分を実質的に低減し、脱水及び/又は乾燥できる。

例えば、味付け海苔、クッキーなどの乾燥食品を封入した防湿容器内に、紙製などの透湿小袋に充填した脱水能を有する環状四糖を共存させておくことにより、容器内の相対湿度を極度に低減させ、乾燥食

品、粉末状物などを高品質かつ安定に長期間維持し得ることが判明した。この際、脱水能を有する環状四糖は、水分を捕捉して5乃至6含水結晶環状四糖に変換される途上及び変換された後においても、べとついたり、流れたりすることがなく、乾燥食品や防湿容器を汚染する心配はない。

さらに、例えば、ブランディー、食酢、ローヤルゼリー、生クリーム、マヨネーズなどの液状、ペースト状などの高水分食品の場合には、脱水能を有する環状四糖を含有させて、5乃至6含水結晶環状四糖に変換させることにより、実質的に水分の低減された高品質の脱水食品、例えば、マスキット状、粉末状などの食品をきわめて容易に製造することができる。

この場合、脱水能を有する環状四糖が食品原材料などに含まれる水分を十分に脱水可能な量以上加えられると、脱水能を有する環状四糖の一部が5乃至6含水結晶環状四糖に変換される。この結果、本発明により得られた脱水食品は、遊離水分が減少しているので、微生物汚染、加水分解、酸敗、褐変などによる変質、劣化を防止し、風味良好で高品質な商品を長期に安定に維持し得る。

本発明の脱水方法は、環状四糖が非還元性糖質で安定であり、かつ、加熱乾燥などの苛酷な条件を必要としないので、液状又はペースト状の高水分食品を変質、劣化させることなく、風味良好で、水分の低減された脱水食品に容易に変換し得る特徴を有している。また、環状四糖自体は、蔗糖の約20%の甘味度を持つ、無毒、無害の甘味料であり、なんら危険性はない。

また、リンホカイン、抗生物質などの水溶液、薬用人参エキス、スッポンエキスなどのペースト状医薬品の場合にも、これらに脱水能を有する環状四糖を含有させて、5乃至6含水結晶環状四糖に変換させ

ることにより、実質的に水分の低減された高品質の脱水医薬品、例えば、マスキット状、粉末状などの医薬品をきわめて容易に製造することができる。この方法は、加熱乾燥などの苛酷な条件を必要とせず、また、脱水能を有する環状四糖が脱水剤としてのみならず、医薬品の有効成分の安定剤としても作用するので、高品質で安定な脱水医薬品を製造することができる。

例えば、バイアル瓶に、充分量の脱水能を有する環状四糖を採り、これに、例えば、リンホカイン、ホルモンなどの生理活性物質を含有する水溶液を加え、密栓して固形製剤などを製造することも有利に実施できる。この場合には、脱水能を有する環状四糖が、生理活性物質を含有する水溶液を脱水することは勿論のこと、バイアル瓶内の雰囲気を防湿乾燥し得る。このようにして得られる脱水固形医薬品は、その製造工程が容易であるだけでなく、その高品質を長期に安定に維持し得ること、更には、使用時に水に速やかに溶解するなどの特徴を有している。

また、充分量の脱水能を有する環状四糖を攪拌しながら、これに生理活性物質を含有する水溶液の所定量を混合し、得られる粉末をそのまま容器に封入して、高品質で安定な固体制剤にすることも、更に、この粉末を、常法にしたがって顆粒、錠剤などに成形して利用することも有利に実施できる。

本発明の脱水能を有する環状四糖を用いる脱水剤は、従来知られているシリカゲル、酸化カルシウムなどの脱水剤とは違って、可食性であり、経口摂取されて難消化性で無カロリー乃至低カロリーの糖質脱水剤であるのみならず、各種生理活性物質などの安定剤としても有利に利用できる。

本発明で用いる環状四糖及び脱水能を有する環状四糖は、その由来、

製法については問わない。また、脱水能を有する環状四糖としては、後述のように、環状四糖の無水物である無水結晶環状四糖及び無水非晶質環状四糖が水分を取り込み 5 乃至 6 含水結晶環状四糖に変換されることから好適である。同様に 1 含水結晶環状四糖もまた水分を取りこみ 5 乃至 6 含水結晶環状四糖に変換され、含水物の脱水作用を発揮する。よって、本発明で用いる脱水能を有する環状四糖はその完全な無水物に限らず、例えば、含水結晶物であっても脱水能を有するものであれば有利に用いることができる。したがって、本発明の脱水能を有する環状四糖を定義するには、それに含まれる水分量で判断することができ、その水分量はカール・フィッシャー法などの公知技術によって測定できる。本発明の脱水剤の有効成分である環状四糖に含まれる水分量は、当然、少ないほどよく、好ましくは 4 % 未満、さらに好ましくは 3 % 未満である。4 % 以上 10 % 未満の水分を含有している場合は脱水能を有しているものの脱水剤としての機能及び効率が低下する。

本発明者等は、本発明に先立って脱水能を有する環状四糖、とりわけ、無水結晶環状四糖、1 含水結晶環状四糖、及び無水非晶質環状四糖の製造方法について研究した。

まず、環状四糖の製造方法としては、例えば、『ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (European Journal of Biochemistry)』、第 226 巻、641 乃至 648 (1994 年) で開示されたアルテルナン (alternan) に加水分解酵素アルテルナナーゼ (alternanase) を作用させる製造方法の他に、本発明者等が、先に特願 2000-229557 号明細書及び特願 2000-234937 号明細書に開示した、澱粉を用いて製造したパノースを  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素



によって環状四糖に変換して製造する方法、及び澱粉を $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を組み合わせる環状四糖を製造する方法などの澱粉質を原料とした酵素法による製造方法がある。さらに、これら先願明細書に記載したように、本発明者等は、環状四糖の製造方法として、アルテルナンよりも  
5 豊富で安価である澱粉質を原料とした酵素法による方法が、高効率かつ安価に製造できることから、工業的に有利に実施できることを明らかにし、更に、環状四糖の形態として5乃至6含水結晶、無水結晶、1含水結晶、無水非晶質などが存在することも初めて明らかにした。

なお、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を  
10 産生する微生物として、平成12年4月25日付けで、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6所在の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、受託番号FERM BP-7143として寄託されているバチルス グロビス  
ポルスC9株、及び、平成12年4月25日付けで、日本国茨城県つくば市東1丁目  
1番地1 中央第6所在の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター  
15 に、受託番号FERM BP-7144として寄託されているバチルス グロビスポ  
ルスC11株が挙げられる。

次に、本発明者等は、無水結晶環状四糖粉末の製造方法について検討し、その方法  
を確立した。即ち、その方法は、例えば、前述の方法で澱粉質から酵素法により得た  
環状四糖水溶液を、水分約15%未満、望ましくは、2.0%以上12%未満の高濃  
20 度シラップとし、このシラップを無水結晶環状四糖の種晶共存下で50乃至180℃  
の温度範囲に維持しつつ、無水結晶環状四糖を晶出させ粉末化して製造する。

また、1含水結晶環状四糖粉末を製造するには、例えば、5乃至6含水結晶環状四  
糖粉末をさらに約100乃至180℃の温度で適度に乾燥して製造する。

さらに、無水非晶質環状四糖粉末を製造するには、例えば、前述の方法で得た環状  
25 四糖水溶液を、例えば、凍結乾燥及び約100乃至180℃の温度で常圧乾燥又は真  
空乾燥した後、粉碎して製造する。また、当該環状四糖水溶液を濃度約40乃至85%  
のシラップとして、凍結乾燥及び真空乾燥した後、粉碎して製造するか、又は、高圧  
ノズル法又は回転円盤法などの噴霧乾燥法により粉末を直接製造することもできる。

粉末化の方法としては、上記の噴霧乾燥法以外にも、例えば、ブロ

ック粉碎方法、押出造粒方法、流動造粒方法などの公知の方法を適宜採用すればよい。

このようにして製造される本発明の脱水能を有する環状四糖粉末は、上品な低甘味を有する非還元性の流動性を有する白色粉末で、その水分含量は低く実質的に無水で、カール・フィッシャー法により、通常、4%未満、好ましくは3%未満である。さらにその形態は無水結晶粉末、1含水結晶粉末又は無水非晶質粉末とすることも可能である。

本発明の脱水能を有する環状四糖粉末は、用途に応じて粒径をサイズ分けを利用することも有利に実施できる。例えば、医薬品のような少量の分封若しくは錠剤などを製造する場合では、粒径が小さいほど有効成分が均一に分散されるため、好都合である。本発明の脱水剤の粉末の粒径はメッシュなどを用いた通常行われている分級手段によって、適宜選択でき、通常、20  $\mu$ m乃至500  $\mu$ m、好ましくは50  $\mu$ m乃至200  $\mu$ mも有利に調製できる。

更に、本発明でいう脱水能を有する環状四糖粉末は、5乃至6含水結晶環状四糖に変換され強力な脱水作用を発揮する実質的な無水物であればよく、例えば、脱水能を有する環状四糖の5乃至6含水結晶環状四糖への変換を促進し脱水剤としての効果を高めるため、種晶としてできるだけ少量、通常5%未満、望ましくは、1%未満の5乃至6含水結晶環状四糖を脱水剤に混合させた粉末を利用することも有利に実施できる。

このようにして得られる脱水能を有する環状四糖粉末は、これを、例えば、食品、医薬品、化粧品、工業化学品などの含水物に含有させると、それに含まれる遊離水分を5乃至6含水結晶環状四糖の結晶水として捕捉し、固定し、含水物に対して強力な脱水剤として作用する。

本発明の脱水剤が有利に適用できる場合として、防湿容器内に共存させて、防湿容器内の雰囲気を除湿、乾燥する場合、または、加熱乾燥、真空乾燥などの工程で変質、劣化を伴い易い含水物又は乾燥困難な含水物に含有若しくは接触させることで、高品質のマスキット状、  
5 粉末状、固体状などの脱水物品を製造する場合などがある。

本発明の脱水剤を除湿、乾燥する場合に適用する場合としては、例えば、味付け海苔、クッキーなどの吸湿防止に利用できる。更には、吸湿して固結し易い粉末状物、例えば、米粉、小麦粉、大豆粉などの穀粉、はったい粉、きな粉、すりゴマなどの加工穀粉、プリンミックス粉、ホットケーキミックス粉などのプレミックス粉、食塩、砂糖などの微細結晶調味料、粉末醤油、粉末味噌、粉末寿司酢、粉末ダシの素、粉末複合調味料などの粉末調味料、粉末パプリカ、粉末にんにく、  
10 粉末シナモン、粉末ナツメグ、粉末ペパー、粉末セージなどの粉末香辛料、粉末酵母エキス、粉末ミルク、粉末ヨーグルト、粉末チーズ、  
15 粉末ジュース、粉末ハーブ、粉末ビタミン、顆粒スープ、顆粒ブイヨン、魚粉、血粉、骨粉、粉末乳酸菌剤、粉末酵素剤、顆粒消化剤などの粉末状物品に脱水能を有する環状四糖を配合して包装封入することにより、包装容器内の相対湿度を低減させ、粉末状物品の付着、固結を防止できるので、製造直後の流動性良好な高品質を長期間維持するなどの目的にも利用することができる。

また、本発明の脱水剤を含水物を脱水する場合に適用させる場合としては、例えば、動物、植物、微生物由来の器官、組織、細胞、摩砕物、抽出物、成分、又はこれらからの調製物など各種含水物を脱水する場合に有利に利用できる。

25 例えば、食品、その原材料又は加工中間物の場合には、生果、ジュース、野菜エキス、豆乳、ゴマペースト、ナッツペースト、生あん、

糊化澱粉ペースト、小麦粉などの農産品、ウニペースト、カキエキス、イワシペーストなどの水産品、生卵、レシチン、牛乳、乳清、生クリーム、ヨーグルト、バター、チーズ、などの畜産品、メープルシラップ、蜂蜜、味噌、醤油、マヨネーズ、ドレッシング、カツオエキス、

5 ミートエキス、昆布エキス、チキンエキス、ビーフエキス、酵母エキス、きのこエキス、甘草エキス、ステビアエキス、これらの酵素処理物、漬物用調味液などの含水調味料、日本酒、ワイン、ブランディー、ウイスキー、薬用酒などの酒類、緑茶、紅茶、コーヒーなどの嗜好飲料、ハッカ、ワサビ、ニンニク、カラシ、サンショウ、シナモン、セ

10 ージ、ローレル、ペパー、柑橘類などから抽出される含水香辛料、セイヨウアカネ、ベニノキ、ウコン、パプリカ、レッドビート、ベニバナ、クチナシ、サフラン、紅麹菌などから抽出される含水着色料、シヨ糖脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル及びソルビタン脂肪酸エステルなどから調製される含水乳化剤、燻液、醗酵液などの保存

15 料などの液状乃至ペースト状物から安定で風味良好な脱水食品を容易に製造することができる。

このようにして得られた脱水食品、例えば、粉末農水畜産品、粉末油脂、粉末香料、粉末着色料、粉末乳化剤、粉末保存料などは、風味良好な天然型バルクフレーバーなどとして、マヨネーズ、スープの素

20 などの調味料、ハードキャンディー、ケーキ、などの菓子類、ホットケーキミックス、即席ジュースなどのプレミックスなども各種飲食物の加工材料として有利に使用することができる。

また、本発明の脱水剤を医薬品、その原料又は加工中間物の場合に適用させる場合としては、インターフェロニン $\alpha$ 、インターフェロニン $\beta$ 、インターフェロニン $\gamma$ 、ツモア・ネクロシス・ファクター $\alpha$ 、

25 ツモア・ネクロシス・ファクター $\beta$ 、マクロファージ遊走阻止因子、

コロニー刺激因子、トランスファーファクター、インターロイキンⅠなどのリンホカイン含有液、インシュリン、成長ホルモン、プロラクチン、エритроポエチン、卵細胞刺激ホルモンなどのホルモン含有液、BCGワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオ生  
5 ワクチン、痘苗、破傷風トキソイド、ハブ抗毒素、ヒト免疫グロブリンなどの生物製剤含有液、ペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、硫酸カナマイシンなどの抗生物質含有液、チアミン、リボフラビン、L-アスコルビン酸、肝油、カロチノイド、エルゴステロール、トコフェロール  
10 などのビタミン含有液、リパーゼ、エラスターゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルカナーゼ、ラクターゼなどの酵素含有液、薬用人参エキス、スッポンエキス、クロレラエキス、アロエエキス、プロポリスエキスなどのエキス類、ウイルス、乳酸菌、酵母などの生菌ペースト、ローヤルゼリーなどの液状乃至ペースト状物も、その有効成分、活性を失うことなく、安定で高品質の脱水医薬品、脱水健康食品などを容易に製造できる。

また、本発明の脱水剤を化粧品、その原料又は加工中間物の場合に適用させる場合には、前記食品、医薬品の場合と同様に、生卵、レシチン、生クリーム、ハチミツ、甘草エキス、香料、着色料、酵素など  
20 を脱水すれば、高品質の脱水化粧品が容易に得られる。本化粧品は、美肌剤、美毛剤、育毛剤などとして有利に利用できる。

また、本発明の脱水剤を脱水物品として酵素の場合に適用させる場合には、食品、医薬品、工業原料などの加工用触媒として、また、治療剤、消化剤などとして、更には酵素洗剤などとしても有利に利用できる。  
25

含水物に脱水能を有する環状四糖を含有、接触又は共存させる方法

としては、目的の脱水物品が完成されるまでに、例えば、混和、混捏、溶解、浸透、散布、塗布、噴霧、注入などの公知の方法が、適宜に選ばれる。

含水物に対する脱水能を有する環状四糖を含有、接触又は共存させる量は、含水物に含まれる水分量と、目的とする脱水物品の性状によっても変わり、必要ならば、含水物を他の公知の方法で部分的に脱水又は濃縮した後に、脱水能を有する環状四糖を含有、接触又は共存させてもよく、通常、含水物 1 重量部に対して、0.001 乃至 200 重量部、望ましくは 0.01 乃至 50 重量部である。

10 本発明で得られる脱水物品、例えば、食品、医薬品、化粧品などは品質を更に向上させるために、適宜な着香料、着色料、呈味料、安定剤、増量剤などを併用することも有利に実施できる。とりわけ、安定剤について、本発明が脱水能を有する環状四糖による強力な脱水方法であることから、抗酸化剤などの低分子化合物に限る必要はなく、従  
15 来、乾燥が困難とされていた水溶性高分子化合物、例えば、可溶性澱粉、デキストリン、プルラン、エルシナン、デキストラン、ザンタンガム、アラビアガム、ローカストビーンガム、グアガム、トラガントガム、タマリンドガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ペクチン、寒天、ゼラチン、アルブミン、カゼイン  
20 などの物質も安定剤として有利に利用できる。

これら水溶性高分子化合物を用いる場合には、例えば、液状乃至ペースト状含水物に、予め水溶性高分子化合物を均一に溶解させ、ついで、これに脱水能を有する環状四糖を混和、混捏などの方法で均一に含有させることにより、微細な 5 乃至 6 含水結晶環状四糖を析出させ  
25 た脱水物品が得られる。

本品は含水物由来の香気成分、有効成分などが高分子化合物の皮膜

で被膜されているか、又は、該皮膜で囲まれたマイクロカプセル中に  
微細な 5 乃至 6 含水結晶環状四糖とともに内包されるか、更には、香  
気成分、有効成分などが環状四糖と包接化合物を形成して安定化され  
ており、その揮散、品質劣化が防止されることから、含水物由来の香  
5 気成分、有効成分の安定保持に極めて優れている。この際、必要なら  
ば水溶性高分子として、香氣成分などと包接化合物を形成する  $\alpha$  -、  
 $\beta$  - 又は  $\gamma$  - シクロデキストリンを併用することも有利に実施でき  
る。

シクロデキストリンとしては、高純度の物に限る必要はなく、乾燥  
10 しにくく粉末化の困難な低純度のシクロデキストリン、例えば、多量  
のマルトデキストリンとともに各種シクロデキストリンを含有した  
水飴状の澱粉部分加水分解物、更にはシクロデキストリンのグルコー  
ス誘導体なども有利に利用できる。

本発明の脱水物品、とりわけ、粉末状物品を製造する方法は、種々  
15 の方法が採用できる。例えば、食品、医薬品、化粧品、それらの原材  
料又は加工中間物などの比較的高水分の含水物に、脱水能を有する環  
状四糖を脱水物品の総重量当り水分約 50 % 以下、望ましくは 10 乃  
至 40 % になるように均一に含有させた後、バットなどに約 0.1 乃  
至 5 日間、約 10 乃至 50 °C、例えば、室温に放置し、5 乃至 6 含水  
20 結晶環状四糖に変換させて、例えばブロック状に固化し、これを切削、  
粉碎などの方法により製造すればよい。必要ならば、切削、粉碎など  
の粉末化工程の後に乾燥工程、分級工程などを加えることもできる。

また、噴霧する方法などにより、直接、粉末品を製造することがで  
きる。例えば、脱水能を有する環状四糖粉末を流動させながら、これ  
25 に液状乃至ペースト状の含水物を所定量噴霧して、接触させて造粒し、  
ついで、必要に応じて約 30 乃至 60 °C で約 0.1 乃至 10 時間熟成

して、5乃至6含水結晶環状四糖に変換させるか、又は、脱水能を有する環状四糖を液状乃至ペースト状含水物に混和、混捏などした後、これを、直ちに、若しくは、5乃至6含水結晶環状四糖への変換を開始させて、噴霧して得られる粉末品を、必要に応じて同様に熟成し、

5 5乃至6含水結晶環状四糖に変換させる方法は、粉末状脱水物品を大量生産する方法として好適である。

このようにして得られた粉末状脱水物品は、そのまま、又は必要に応じて、増量剤、賦形剤、結合剤、安定剤などを併用して、更には、顆粒、錠剤、カプセル剤、棒状、板状、立方体形など適宜な形状に成型して利用することも自由にできる。

また、一般に、澱粉は、その膨潤、糊化のために、多量の水分を必要としている。したがって、糊化澱粉は極めて微生物汚染を受けやすい。脱水能を有する環状四糖は、このような糊化澱粉の脱水剤としても有効に利用できる。例えば、求肥などの糊化澱粉は、これに脱水能

15 を有する環状四糖を含有させ5乃至6含水結晶環状四糖に変換させることにより、実質的に水分が低減され、微生物汚染を防止することができる。

さらに、脱水能を有する環状四糖は、糊化澱粉に対して容易に均一に混和し、後述するように老化防止剤としても作用することから、糊化澱粉を含有する各種加工食品の商品寿命を大幅に延長することができる。

また、脱水能を有する環状四糖は、例えば、皮むきバナナ、オレンジ、スライスした蒸し芋、開いた鰯、秋刀魚、生麺、ゆで麺、餅菓子などの表面に微生物汚染を受けやすい高水分含有食品に用いられる

25 場合には、その表面に、例えば、脱水能を有する環状四糖粉末をまぶして接触させ、5乃至6含水結晶環状四糖に変換させ、その表面の水



分を実質的に低減し、これら食品の日持ちを向上し、品質を改良することから食品の防腐剤、安定剤、品質改良剤などとして有利に利用できる。この際、必要ならば、例えば、乳酸、クエン酸、エタノールなどを併用して、また、真空包装、ガス充填包装、冷蔵などして、その  
5 商品寿命を更に延長させることも自由である。

また、脱水能を有する環状四糖は、アルコールに対し高い親和力を示す。この性質から、メタノール、エタノール、ブタノール、プロピレングリコール、グリセリン、ポリエチレングリコールなどのアルコール又はアルコール可溶物などに含まれる水分の脱水剤としても有  
10 利に利用できる。

例えば、清酒、焼酎、ワイン、ブランディー、ウイスキー、ウォッカなどの酒類を脱水能を有する環状四糖で脱水し、生成した5乃至6含水結晶環状四糖にその有効成分、香気などを保持したマスキット状、粉末状などとして有利に製造することができる。このようにして製造  
15 した粉末酒類は菓子、プレミックスなどに利用でき、水で復元して飲用に供することもできる。

本発明の脱水能を有する環状四糖は、脱水剤、安定剤としてだけでなく、脱水物品中に含有させることで、上品な甘味質、ボディー、適度な粘度付与剤などとしての効果をも発揮することができる。

また、ヨウ素などのアルコール溶液を脱水能を有する環状四糖と混合し、これに水溶性高分子などを含有する水溶液に加えて5乃至6含水結晶環状四糖に変換させることにより、ヨウ素などの有効成分を揮発、変質させることなく安定に保持し、かつ、適度の粘度、延び、付着性を有するマスキット状の膏薬などを製造することも有利に実施  
20 できる。  
25

また脱水能を有する環状四糖に含水油溶性物質、乳化物、ラテック

スなどを含浸、混合などして脱水能を有する環状四糖を5乃至6含水結晶環状四糖に変換させ、粉末状の油脂、香辛料、香料、着色料などの食品、化粧品、粉末状のビタミン、ホルモンなどの医薬品などを製造することも有利に実施できる。

- 5       この場合には、脱水能を有する環状四糖は脱水剤としてのみならず、5乃至6含水結晶環状四糖に変換した後においても、安定剤、保持剤、賦形剤、担体などとしても作用する。

10       また、チョコレート、クリームなどの水分を嫌う油溶性物質含有食品の場合にも、脱水能を有する環状四糖は有利に利用される。この場合には、脱水剤としてのみならず、加工適性、口溶け、風味などが良好になることに利用される。更に、得られた製品は、その高品質を長期にわたって安定に維持し得る特徴を有している。

15       以上述べたように、本発明の非還元性糖質である脱水能を有する環状四糖が各種含水物の水分を強力に脱水する、加えて、得られる脱水物品が極めて安定であることを見いだしたことによって達成されたものであり、その脱水能を有する環状四糖を脱水剤として利用することにより、液状乃至ペースト状などの含水物から、環状四糖の特徴である包接作用によって、その風味、香気を劣化、揮散させることなく、水分の低減された高品質の食品、化粧品や、また、その有効成分、活性を分解低下させることなく、水分の低減された高品質の医薬品、化粧品などを有利に製造することができる。

次に本発明の脱水剤の使用例について述べる。

25       脱水能を有する環状四糖は低甘味であって、虫歯誘発、血中コレステロール及び／又は血糖値の上昇などの懸念がない調味料としても使用することができる。必要ならば、例えば、粉飴、ぶどう糖、異性化糖、砂糖、麦芽糖、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース、蜂蜜、メープルシュガ

ー、ソルビトール、マルチトール、ジヒドロカルコン、ステビオシド、  
α-グリコシルステビオシド、ラカンカ甘味物、グリチルリチン、ソ  
ーマチン、L-アスパラチルフェニルアラニンメチルエステル、アセ  
スルファムK、スクラロース、サッカリン、グリシン、アラニンなど  
5 のような他の甘味料と、また、デキストリン、澱粉、乳糖などのよう  
な増量剤と混合して使用することもできる。

脱水能を有する環状四糖は、非還元性糖質であって環状四糖本来の  
上品な低甘味を有し、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの他の  
呈味を有する各種の物質とよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、  
10 一般食品への脱水剤としてのみならず、甘味付に、また呈味改良、品  
質改良、風味改善などに利用することも有利に実施できる。

例えば、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、フリ  
カケ、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、粉末すし酢、中華  
の素、天つゆ、麺つゆ、ソース、ケチャップ、焼き肉のタレ、カレー  
15 ルウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、複合調味料、みりん、  
新みりん、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなど各種調味料への  
脱水剤として、更には、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、風味改良  
剤などとして使用することも有利に実施できる。また、例えば、せん  
べい、あられ、おこし、求肥、餅類、まんじゅう、ういろう、あん類、  
20 羊羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パ  
ン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、プリン、バタークリ  
ーム、カスタードクリーム、シュークリーム、ワッフル、スポンジケ  
ーキ、ドーナツ、チョコレート、チューインガム、キャラメル、ヌガ  
ー、キャンディーなどの各種洋菓子、アイスクリーム、シャーベット  
25 などの氷菓、果実のシロップ漬、氷蜜などのシロップ類、フラワーペ  
ースト、ピーナッツペースト、フルーツペーストなどのペースト類、

ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、福神漬け、べったら漬、千枚漬、らっきょう漬などの漬物類、たくあん漬の素、白菜漬の素などの漬物の素類、ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、魚肉ソーセージ、カマボコ、チクワ、天ぷらなどの魚肉製品、ウニ、イカの塩辛、酢コンブ、さきするめ、ふぐのみりん干し、タラ、タイ、エビなどの田麩などの各種珍味類、海苔、山菜、するめ、小魚、貝などで製造される佃煮類、煮豆、ポテトサラダ、コンブ巻などの惣菜食品、乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜の瓶詰、缶詰類、合成酒、増醸酒、果実酒、酒などの酒類、珈琲、ココア、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、即席ジュース、即席コーヒー、即席しるこ、即席スープなどの即席飲料などの各種食品への脱水剤として、更には甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、風味改善などとして利用することも有利に実施できる。

以下、本発明で用いられる環状四糖の製造方法及び性質について述べる。

#### 実験 1 培養物からの環状四糖の調製

澱粉部分分解物（商品名『パインデックス#1』、松谷化学株式会社製造）5 w/v %、酵母抽出物（商品名『アサヒミースト』、アサヒビール株式会社製造）1.5 w/v %、リン酸二カリウム0.1 w/v %、リン酸一ナトリウム12含水塩0.06 w/v %、硫酸マグネシウム7含水塩0.05 w/v %、及び水からなる液体培地を、500 ml 容三角フラスコに100 mlを入れ、オートクレーブで121℃、20分間滅菌し、冷却して、バチルス グロビスポルス C9（FERM B P-7143）を接種し、27℃、230 rpmで48時間回転振盪培養した後、遠心分離して菌体を除き培養上清を得た。

さらに、その培養上清をオートクレーブ（１２０℃、１５分間）し、放冷した後、不溶物を遠心分離して除き上清を回収した。

得られた上清中の糖質を調べるため、展開溶媒としてｎ－ブタノール、ピリジン、水混液（容量比６：４：１）、薄層プレートとしてメルク社製『キーゼルゲル６０』（アルミプレート、２０×２０ｃｍ）を用い２回展開するシリカゲル薄層クロマトグラフィー（以下、「ＴＬＣ」と略す。）を行ない、上清中の糖質を分離した。検出法として、分離した全糖質を硫酸－メタノール法で発色し、また、還元糖質をジフェニルアミン－アニリン法で発色して調べたところ、Ｒｆ値が約０．  
31の位置に硫酸－メタノール法で陽性、かつ、ジフェニルアミン－アニリン法で陰性の非還元性糖質が検出された。

先に得た上清約９０ｍｌをｐＨ５．０、温度４５℃に調整した後、 $\alpha$ －グルコシダーゼ（商品名『トランスグルコシダーゼＬ「アマノ」』、アマノ製薬株式会社製造）を固形物１グラム当り１，５００単位とグルコアミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社製造）を固形物１グラム当り７５単位添加して２４時間処理し、続いて、水酸化ナトリウムでｐＨを１２に調整し２時間煮沸して、残存する還元糖を分解した。不溶物を濾過して除去した後、三菱化学製イオン交換樹脂『ダイアイオンＰＫ２１８』と『ダイアイオンＷＡ３０』を用いて脱色、脱塩し、さらに、三菱化学製カチオン交換樹脂『ダイアイオンＳＫ－１Ｂ』とオルガノ製アニオン交換樹脂『ＩＲＡ４１１』で再度脱塩し、活性炭で脱色し、精密濾過した後、エバポレータで濃縮し凍結真空乾燥して固形物として約０．６ｇの糖質粉末を得た。

得られた糖質の組成を高速液体クロマトグラフィー法（以下、ＨＰＬＣと略称する。）で調べたところ、図１に示すように、溶出時間１０．８４分に単一ピークのみが検出され、純度は９９．９％以上で極

めて高純度であることが判明した。なお、HPLCは、『ショウデックス (Shodex) KS-801 カラム』(昭和電工株式会社製造) を用いカラム温度 60℃、流速 0.5 ml/min 水の条件で行い、検出は示差屈折計『RI-8012』(東ソー株式会社製造) を用いて行なった。

また、還元力をソモギー・ネルソン法で測定したところ、その還元力は検出限界以下であり、本標品は実質的に非還元性糖質であると判断される。

## 実験 2 環状四糖の構造解析

実験 1 の方法で得られた非還元性糖質について、高速原子衝撃法による質量分析 (通称「FAB-MS」) したところ、質量数 649 のプロトン付加分子イオンが顕著に検出され、本糖質の質量数が 648 であることが判明した。

また、常法にしたがって、硫酸を用い加水分解し、ガスクロマトグラフィー法で構成糖を調べたところ、D-グルコースのみが検出され、本糖質の構成糖は D-グルコースであることも判明し、質量数をも考慮すると、本糖質はグルコース 4 分子からなる環状糖質であることが推測された。

さらに、本糖質を用いて核磁気共鳴法 (通称 NMR) を行ったところ、図 2 に示す  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルと、図 3 に示す  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルが得られ、これらスペクトルを既知糖質のものと異同を比較したところ、『ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (European Journal of Biochemistry)』、641 乃至 648 頁 (1994 年) に記載されている非還元性環状糖質サイクロ { $\rightarrow 6$ }- $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピ

ラノシルー（ $1 \rightarrow 3$ ）- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー（ $1 \rightarrow$ ）のスペクトルと一致し、本糖質の構造が図4に示す環状四糖、即ち、サイクロ $\{ \rightarrow 6 \}$ - $\alpha$ -D-グルコピラノシルー（ $1 \rightarrow 3$ ）- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー（ $1 \rightarrow 6$ ）- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー（ $1 \rightarrow 3$ ）- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー（ $1 \rightarrow$ ）であることが判明した。

実験3 バチルス グロビスポルス C9からの $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の生産

澱粉部分分解物（商品名『パインデックス#4』、松谷化学株式会社製造）4.0w/v%、酵母抽出物（商品名『アサヒミースト』（アサヒビール株式会社製造）1.8w/v%、リン酸二カリウム0.1w/v%、リン酸一ナトリウム12含水塩0.06w/v%、硫酸マグネシウム7含水塩0.05w/v%、及び水からなる液体培地を、500ml容三角フラスコに100mlずつ入れ、オートクレーブで121℃、20分間滅菌し、冷却して、バチルス グロビスポルス C9（FERM BP-7143）を接種し、27℃、230rpmで48時間回転振盪培養したものを種培養とした。

容量30lのファーマンターに種培養の場合と同組成の培地を約20l入れて、加熱滅菌、冷却して温度27℃とした後、種培養液1v/v%を接種し、温度27℃、pH6.0乃至8.0に保ちつつ、48時間通気攪拌培養した。培養後、培養液中の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は約0.45単位/mlで、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性は約1.5単位/mlで、環状四糖生成活性は約0.95単位/mlであり、遠心分離（10,000rpm、30分間）して回収した上清約18lの酵素活性を測定したところ、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は約0.45単位/mlの活性（総活性約8,110単位）で、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は約1.5単位

／m l の活性（総活性約 2 6 , 9 0 0 単位）で、環状四糖生成活性は約 0 . 9 5 単位／m l （総活性約 1 7 , 1 0 0 単位）であった。

なお、酵素活性は次のようにして測定した。即ち、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性の測定は、マルトトリオースを濃度 2 w  
5 / v % となるよう 1 0 0 m M 酢酸緩衝液（p H 6 . 0）に溶解させて基質液とし、その基質液 0 . 5 m l に酵素液 0 . 5 m l 加えて、3 5 °C で 6 0 分間酵素反応し、その反応液を 1 0 分間煮沸して反応を停止させた後、その反応液中に主に生成するイソマルトシルマルトースとマルトースのうち、このマルトース量を、実験 1 に記載の H P L C 法で  
10 定量することによって行った。 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の活性 1 単位は、上記の条件下で 1 分間に 1  $\mu$ モルのマルトースを生成する酵素量とした。

また、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性の測定は、パノースを濃度 2 w / v % となるよう 1 0 0 m M 酢酸緩衝液（p H 6 . 0）に溶解させ基質液とし、その基質液 0 . 5 m l に酵素液 0 . 5 m l 加えて、3  
15 5 °C で 3 0 分間酵素反応し、その反応液を 1 0 分間煮沸して反応を停止させた後、その反応液中に主に生成する環状四糖とグルコースのうち、このグルコース量をグルコースオキシダーゼ法で定量することによって行った。 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の活性 1 単位は、上記の  
20 条件下で 1 分間に 1  $\mu$ モルのグルコースを生成する酵素量とした。

環状四糖生成活性の測定は、澱粉部分分解物（商品名『パインデックス # 1 0 0』、松谷化学株式会社製造）を濃度 2 w / v % となるよう 5 0 m M 酢酸緩衝液（p H 6 . 0）に溶解させ基質液とし、その基質液 0 . 5 m l に酵素液 0 . 5 m l 加えて、3 5 °C で 6 0 分間酵素反  
25 応し、その反応液を 1 0 0 °C で 1 0 分間熱処理して反応を停止させた後、更に、 $\alpha$ -グルコシダーゼ（商品名『トランスグルコシダーゼ L



「アマノ」、天野製薬製造) 70 単位/ml とグルコアミラーゼ (ナガセ生化学工業株式会社販売) 27 単位/ml とを含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 1 ml を加えて、50 °C で 60 分間処理し、その液を 100 °C で 10 分間熱処理して酵素を失活させた後、環状四糖  
5 量を実験 1 に記載の HPLC 法で定量することによって行った。環状四糖生成活性 1 単位は、上記の条件下で 1 分間に 1  $\mu$ モルの環状四糖を生成する酵素量とした。

#### 実験 4 バチルス グロビスポルス C9 由来酵素の調製

##### 実験 4-1 バチルス グロビスポルス C9 由来酵素の精製

10 実験 3 で得られた培養上清約 18 l を 80% 飽和硫酸液で塩析して 4 °C、24 時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離 (10,000 rpm、30 分間) して回収し 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解後、同緩衝液に対して透析して粗酵素液約 400 ml を得た。この粗酵素液は、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を  
15 8,110 単位と、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性を 24,700 単位と、環状四糖生成活性を約 15,600 単位有していた。この粗酵素液を三菱化学株式会社製『セパビーズ (Sepabeads) FPD A13』ゲルを用いたイオン交換クロマトグラフィー (ゲル容量 1,000 ml) に供した。この際、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖  
20 質生成酵素、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素及び環状四糖のいずれも、『セパビーズ (Sepabeads) FPD A13』ゲルに吸着せずに、非吸着画分に溶出した。この酵素液を 1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、その透析液を遠心分離して不純物を除き、アマシャム・ファルマシア・バイオテック株式会社製『セ  
25 ファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィー (ゲル量 500 ml) に供した。

酵素活性成分は、『セファクリル (S e p h a c r y l) H R S - 2  
0 0』ゲルに吸着し、硫酸 1 M から 0 M のリニアグラジエント、更に  
続いて、マルトテトラオース 0 m M から 1 0 0 m M のリニアグラジエ  
ントで溶出させたところ、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  
5  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とは分離して溶出し、 $\alpha$ -イソマルトシ  
ル転移酵素活性は硫酸のリニアグラジエントでその濃度が約 0 M 付  
近に溶出し、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は、マルト  
テトラオースのリニアグラジエントでその濃度が約 3 0 m M 付近に  
溶出した。そこで、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性画分と $\alpha$ -イソ  
10 マルトシルグルコ糖質生成酵素活性画分とを別々に集め回収した。ま  
た、環状四糖生成活性は本カラムクロマトグラフィーのいずれの画分  
にも認められないことがわかり、また、得られた $\alpha$ -イソマルトシル  
グルコ糖質生成酵素画分と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素画分とを混  
合した酵素液は環状四糖生成活性を示すこともわかり、澱粉部分分解  
15 物から環状四糖を生成する活性は $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素と $\alpha$ -  
イソマルトシルグルコ糖質生成酵素との両酵素活性の共同作用に  
よって発揮されることが判明した。

以下、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソマルトシ  
ル転移酵素とを別々に精製する方法について述べる。

#### 20 実験 4 - 2 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の精製

実験 4 - 1 で得た $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分を  
1 M 硫酸を含む 1 0 m M リン酸緩衝液 (p H 7 . 0) に透析し、その  
透析液を遠心分離して不溶物を除き、東ソー株式会社製『ブチルート  
ヨパール (B u t y l - T o y o p e a r l) 6 5 0 M』ゲルを用い  
25 た疎水クロマトグラフィー (ゲル量 3 5 0 m l) に供した。本酵素は、  
『ブチルートヨパール (B u t y l - T o y o p e a r l) 6 5 0 M』

ゲルに吸着し、硫酸 1 M から 0 M のリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約 0.3 M 付近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、この回収液を 1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この精製の各ステップにおける  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性量、比活性、収率を表 1 に示す。

表 1

工 程	$\alpha$ -イソマルト シルグルコ糖質 生成酵素活性量 (単位)	$\alpha$ -イソマルト シルグルコ糖質 生成酵素比活性 (単位/mg蛋白質)	収 率 (%)
培養上清	8, 110	0.12	100
硫酸塩析後の透析液	7, 450	0.56	91.9
イオン交換カラム 溶出液	5, 850	1.03	72.1
アフィニティークラム 溶出液	4, 040	8.72	49.8
疎水カラム 溶出液	3, 070	10.6	37.8
アフィニティークラム 溶出液	1, 870	13.6	23.1

精製した  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を 7.5 w/v % 濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは単一で純度の高い標品であった。

#### 実験 4-3 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の精製

実験 4-1 に記載のアフィニティークロマトグラフィーによって  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分と分離した  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素画分を、1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、東ソー株式会社製『ブチルートヨパール (Butyl-Toyoppear

1) 650 M』ゲルを用いた疎水クロマトグラフィー（ゲル量 350 ml）に供した。本酵素は、『ブチルートヨパール（Butylopearl）650 M』ゲルに吸着し、硫酸 1 M から 0 M のリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約 0.3 M 付近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、この回収液を 1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル（Sephacryl）HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この精製の各ステップにおける  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性量、比活性、収率を表 2 に示す。

表 2

工 程	$\alpha$ -イソマルトシル転移 酵素活性量 (単位)	$\alpha$ -イソマルトシル転移 酵素比活性 (単位/mg蛋白質)	収 率 (%)
培養上清	26,900	0.41	100
硫酸塩析後の透析液	24,700	1.85	91.8
イオン交換カラム 溶出液	19,400	3.41	72.1
アフィニティークラム 溶出液	13,400	18.6	49.8
疎水カラム 溶出液	10,000	21.3	37.2
アフィニティークラム 溶出液	6,460	26.9	24.0

実験 5  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の性質

15 実験 5-1  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の性質

実験 4-2 の方法で得た精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ゲル濃度 7.5 w/v %）に供し、同時に泳動した分子量マーカー（日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製）と比較して本酵素の分子量を測

定したところ、分子量約 140,000 ± 20,000 ダルトンであった。

精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を 2 w / v % アンフォライン（アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製）含有等  
5 電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンド  
及びゲルの pH を測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点は  
pI 約 5.2 ± 0.5 であった。

本酵素活性に及ぼす温度、pH の影響を活性測定の方法に準じて調  
べた。なお、温度の影響については、 $\text{Ca}^{2+}$  非存在下と 1 mM 存在  
10 下で測定した。これらの結果を図 5（温度の影響）、図 6（pH の影  
響）を示した。酵素の至適温度は、pH 6.0、60 分間反応で約 40℃（ $\text{Ca}^{2+}$  非存在）、約 45℃（ $\text{Ca}^{2+}$  1 mM 存在）、至適 pH は、  
35℃、60 分間反応で約 6.0 乃至 6.5 であった。本酵素の温度  
安定性は、酵素溶液（20 mM 酢酸緩衝液、pH 6.0）を  $\text{Ca}^{2+}$   
15 非存在下又は 1 mM 存在下で各温度に 60 分間保持し、水冷した後、  
残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH 安定性は、  
本酵素を各 pH 5.0 mM 緩衝液中で 4℃、24 時間保持した後、pH  
を 6.0 に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。  
それぞれの結果を図 7（温度安定性）、図 8（pH 安定性）に示した。  
20 本酵素の温度安定性は約 35℃ まで（ $\text{Ca}^{2+}$  非存在）、約 40℃ まで  
（ $\text{Ca}^{2+}$  1 mM 存在）で、pH 安定性は約 4.5 乃至 9.0 であっ  
た。

本酵素活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度 1 mM の各種金属塩  
存在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表 3 に示す。

金属イオン	相対活性 (%)	金属イオン	相対活性 (%)
無添加	100	Hg <sup>2+</sup>	4
Zn <sup>2+</sup>	92	Ba <sup>2+</sup>	65
Mg <sup>2+</sup>	100	Sr <sup>2+</sup>	80
Ca <sup>2+</sup>	115	Pb <sup>2+</sup>	103
Co <sup>2+</sup>	100	Fe <sup>2+</sup>	98
Cu <sup>2+</sup>	15	Fe <sup>3+</sup>	97
Ni <sup>2+</sup>	98	Mn <sup>2+</sup>	111
Al <sup>3+</sup>	99	EDTA	20

表3の結果から明らかなように、本酵素活性は、Hg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、EDTAで著しく阻害され、Ba<sup>2+</sup>、Sr<sup>2+</sup>で阻害された。Ca<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>で活性化されることも判明した。

- 5     本酵素のN末端アミノ酸配列を、プロテインシーケンサー モデル 473A（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて分析したところ、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列チロシンーバリンーセリンーセリンーロイシンーグリシンーアスパラギンーロイシンーイソロイシンのN末端アミノ酸配列を有していることがわかった。

#### 10   実験5-2   α-イソマルトシル転移酵素の性質

- 実験4-3の方法で得た精製α-イソマルトシル転移酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ゲル濃度7.5w/v%）に供し、同時に泳動した分子量マーカー（日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製）と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約112,000±20,000ダルトンであった。

精製α-イソマルトシル転移酵素標品を2w/v%アンフォライン（アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製）含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンド及びゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点はpI約5.

5 ± 0.5 であった。

本酵素活性に及ぼす温度、pHの影響を活性測定の方法に準じて調べた。結果を図9（温度の影響）、図10（pHの影響）を示した。酵素の至適温度は、pH6.0、30分間反応で約45℃、至適pHは、35℃、30分間反応で約6.0であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液（20mM酢酸緩衝液、pH6.0）を各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pH50mM緩衝液中で4℃、24時間保持した後、pHを6.0に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図11（温度安定性）、図12（pH安定性）を示した。本酵素の温度安定性は約40℃まで、pH安定性は約4.0乃至9.0であった。

本酵素活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度1mMの各種金属塩存在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表4に示す。

15 表4

金属イオン	相対活性(%)	金属イオン	相対活性(%)
無添加	100	Hg <sup>2+</sup>	1
Zn <sup>2+</sup>	88	Ba <sup>2+</sup>	102
Mg <sup>2+</sup>	98	Sr <sup>2+</sup>	101
Ca <sup>2+</sup>	101	Pb <sup>2+</sup>	89
Co <sup>2+</sup>	103	Fe <sup>2+</sup>	96
Cu <sup>2+</sup>	57	Fe <sup>3+</sup>	105
Ni <sup>2+</sup>	102	Mn <sup>2+</sup>	106
Al <sup>3+</sup>	103	EDTA	104

表4の結果から明らかなように、本酵素活性は、Hg<sup>2+</sup>で著しく阻害され、Cu<sup>2+</sup>で阻害された。また、Ca<sup>2+</sup>で活性化されないことも、EDTAで阻害されないこともわかった。

20 本酵素のN末端アミノ酸配列を、『プロテインシーケンサー モデ

ル 4 7 3 A』(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて分析したところ、配列表における配列番号 2 に示すアミノ酸配列のイソロイシンーアスパラギン酸ーグリシンーバリンーチロシンーヒスチジンーアラニンープロリンーアスパラギンーグリシンの N 末端アミノ酸配列を有していることがわかった。

実験 6 バチルス グロビスポルス C 1 1 からの  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の生産

澱粉部分分解物『パインデックス # 4』4.0 w/v %、酵母抽出物『アサヒミースト』1.8 w/v %、リン酸二カリウム 0.1 w/v %、リン酸一ナトリウム 12 含水塩 0.06 w/v %、硫酸マグネシウム 7 水塩 0.05 w/v %、及び水からなる液体培地を、500 ml 容三角フラスコに 100 ml ずつ入れ、オートクレーブで 121℃、20 分間滅菌し、冷却して、バチルス グロビスポルス C 1 1 (FERM B P-7144) を接種し、27℃、230 rpm で 48 時間回転振盪培養したものを種培養とした。

容量 30 l のフェーマンターに種培養の場合と同組成の培地を約 20 l 入れて、加熱滅菌、冷却して温度 27℃とした後、種培養液 1 v/v % を接種し、温度 27℃、pH 6.0 乃至 8.0 に保ちつつ、48 時間通気攪拌培養した。培養後、培養液中の本酵素活性は約 0.55 単位/ml で、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性は約 1.8 単位/ml で、環状四糖生成活性は約 1.1 単位/ml であり、遠心分離 (10,000 rpm、30 分間) して回収した上清約 18 l の酵素活性を測定したところ、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は約 0.51 単位/ml の活性 (総活性約 9.180 単位) で、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は約 1.7 単位/ml の活性 (総活性約 30.400 単位) で、環状四糖生成活性は約 1.1 単位/ml (総活性約 1



9, 400 単位) であった。

#### 実験7 バチルス グロビスポルス C11 由来酵素の調製

##### 実験7-1 バチルス グロビスポルス C11 由来酵素の精製

実験6で得られた培養上清約18 lを80%飽和硫酸液で塩析し  
5 て4℃、24時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離(10, 000 rpm、30分間)して回収し10 mMリン酸緩衝液(pH 7.5)に溶解後、同緩衝液に対して透析して粗酵素液約416 mlを得た。この粗酵素液は、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を8, 440 単位、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性を約28, 000  
10 単位、環状四糖生成活性を約17, 700 単位を有することが判明した。この粗酵素液を、実験4-1に記載の『セパビーズ(Sepabeads) FP-D A13』ゲルを用いたイオン交換クロマトグラフィーに供した。 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性、環状四糖生成いずれも、『セパビーズ(Sepabeads) FP-D A13』ゲルに吸着せずに、非吸着画分に溶出した。この酵素液を1 M硫酸を含む10 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、アマ  
15 シャム・ファルマシア・バイオテック株式会社製『セファクリル(Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィー(ゲル量500 ml)に供した。酵素活性は、『セ  
20 ファクリル(Sephacryl) HR S-200』ゲルに吸着し、硫酸1 Mから0 Mのリニアグラジエント、更に続いて、マルトテトラオース0 mMから100 mMのリニアグラジエントで溶出させたと  
ころ、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素と $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質  
25 生成酵素は分離して溶出し、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性は硫酸のリニアグラジエントでその濃度が約0.3 M付近で溶出し、 $\alpha$ -イ

ソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は、マルトテトラオースのリニアグラジエントでその濃度が約 30 mM 付近で溶出した。そこで、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性画分と  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分とを別々に集め回収した。実験 4 に記載の C9 株の場合と同様に、環状四糖生成活性は本カラムクロマトグラフィーのいずれの画分にも認められないことがわかり、また、得られた  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素画分と  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分とを混合した酵素液は環状四糖生成活性を示すこともわかり、澱粉部分分解物から環状四糖を生成する活性は  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素との両酵素活性の共同作用によって発揮されることが判明した。

以下、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを別々に精製する方法について述べる。

#### 実験 7-2 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の精製

$\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分を 1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、東ソー株式会社製『ブチルートヨパール (Butyl-ToyopEARL) 650 M』ゲルを用いた疎水クロマトグラフィー (ゲル量 350 ml) に供した。本酵素は、『ブチルートヨパール (Butyl-ToyopEARL) 650 M』ゲルに吸着し、硫酸 1 M から 0 M のリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約 0.3 M 付近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、この回収液を 1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この

精製の各ステップにおける $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性量、比活性、収率を表5に示す。

表 5

工 程	$\alpha$ -イソマルトシル グルコ糖質生成酵素 活性量 (単位)	$\alpha$ -イソマルトシル グルコ糖質生成酵素 比活性 (単位/mg 蛋白)	収 率 (%)
培養上清	9, 180	0.14	100
硫酸塩析後の透析液	8, 440	0.60	91.9
イオン交換カラム溶出液	6, 620	1.08	72.1
アフィニティー カラム溶出液	4, 130	8.83	45.0
疎水カラム溶出液	3, 310	11.0	36.1
アフィニティー カラム溶出液	2, 000	13.4	21.8

- 5 精製した $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を7.5w/v %濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは単一で純度の高い標品であった。

#### 実験7-3 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の精製

- 実験7-1に記載のアフィニティークロマトグラフィーによって  
 10  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分と分離した $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素画分を、1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、東ソー株式会社製『ブチルートヨパール(Butyl-Toyoppearl)650M』ゲルを用いた疎水クロマトグラフィー(ゲル量350  
 15 ml)に供した。本酵素は、『ブチルートヨパール(Butyl-Toyoppearl)650M』ゲルに吸着し、硫酸1Mから0Mのリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約0.3M付近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、

この回収液を 1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この精製の各ステップにおける  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性量、比活性、収率を表 6 に示す。

表 6

工 程	$\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性量 (単位)	$\alpha$ -イソマルトシル転移酵素比活性 (単位/mg 蛋白)	収 率 (%)
培養上清	30,400	0.45	100
硫酸塩析後の透析液	28,000	1.98	92.1
イオン交換カラム溶出液	21,800	3.56	71.7
アフィニティークラム溶出液	13,700	21.9	45.1
疎水カラム溶出液	10,300	23.4	33.9
アフィニティークラム溶出液	5,510	29.6	18.1

#### 実験 8 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の調製

##### 実験 8-1 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の性質

- 10 実験 7-2 の方法で得た精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (ゲル濃度 7.5 w/v %) に供し、同時に泳動した分子量マーカー (日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製) と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約 137,000  $\pm$  20,000 ダルトンであった。
- 15

精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を 2 w/v % アンフォライン (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製) 含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンド

及びゲルの pH を測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点は  $pI$  約 5.2 ± 0.5 であった。

本酵素活性に及ぼす温度、pH の影響を活性測定の方法に準じて調べた。なお、温度の影響については、 $Ca^{2+}$  非存在下と 1 mM 存在下で測定した。これらの結果を図 13 (温度の影響)、図 14 (pH の影響) を示した。酵素の至適温度は、pH 6.0、60 分間反応で約 45 °C ( $Ca^{2+}$  非存在)、約 50 °C ( $Ca^{2+}$  1 mM 存在)、至適 pH は、35 °C、60 分間反応で約 6.0 であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液 (20 mM 酢酸緩衝液、pH 6.0) を  $Ca^{2+}$  非存在下又は 1 mM 存在下で各温度に 60 分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH 安定性は、本酵素を各 pH 5.0 mM 緩衝液中で 4 °C、24 時間保持した後、pH を 6.0 に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図 15 (温度安定性)、図 16 (pH 安定性) に示した。本酵素の温度安定性は約 40 °C まで ( $Ca^{2+}$  非存在)、約 45 °C まで ( $Ca^{2+}$  1 mM 存在) で、pH 安定性は約 5.0 乃至 10.0 であった。

本酵素活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度 1 mM の各種金属塩存在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表 7 に示す。

20 表 7

金属イオン	相対活性 (%)	金属イオン	相対活性 (%)
無添加	100	Hg <sup>2+</sup>	4
Zn <sup>2+</sup>	91	Ba <sup>2+</sup>	65
Mg <sup>2+</sup>	98	Sr <sup>2+</sup>	83
Ca <sup>2+</sup>	109	Pb <sup>2+</sup>	101
Co <sup>2+</sup>	96	Fe <sup>2+</sup>	100
Cu <sup>2+</sup>	23	Fe <sup>3+</sup>	102
Ni <sup>2+</sup>	93	Mn <sup>2+</sup>	142
Al <sup>3+</sup>	100	EDTA	24

表7の結果から明らかなように、本酵素活性は、Hg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、EDTAで著しく阻害され、Ba<sup>2+</sup>、Sr<sup>2+</sup>で阻害された。Ca<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>で活性化されることも判明した。

- 5 本酵素のN末端アミノ酸配列を、『プロテインシーケンサー モデル473A』（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて分析したところ、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列N末端チロシンーバリンーセリンーセリンーロイシンーグリシンーアスパラギンーロイシンーイソロイシンのN末端アミノ酸配列を有していること
- 10 がわかった。

このN末端アミノ酸配列結果を実験5-1のバチルス・グロビシポルスC9由来の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素のN末端配列と比較すると同一であることが判明し、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の共通するN末端アミノ酸配列は、配列表における配列

15 番号1に示すアミノ酸配列チロシンーバリンーセリンーセリンーロイシンーグリシンーアスパラギンーロイシンーイソロイシンのN末端アミノ酸配列であることが判明した。

#### 実験8-2 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の性質

実験7-3の方法で得た精製 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を

S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ゲル濃度 7.5 w / v %）に供し、同時に泳動した分子量マーカー（日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製）と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約 102,000 ± 20,000 ダルトンであった。

5 精製 α-イソマルトシル転移酵素標品を 2 w / v % アンフォライン（アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製）含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンド及びゲルの p H を測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点は p I 約 5.6 ± 0.5 であった。

10 本酵素活性に及ぼす温度、p H の影響を活性測定の方法に準じて調べた。結果を図 17（温度の影響）、図 18（p H の影響）を示した。酵素の至適温度は、p H 6.0、30 分間反応で約 50 °C、至適 p H は、35 °C、30 分間反応で約 5.5 乃至 6.0 であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液（20 mM 酢酸緩衝液、p H 6.0）を各温度に 60 分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、p H 安定性は、本酵素を各 p H 50 mM 緩衝液中で 4 °C、24 時間保持した後、p H を 6.0 に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図 19（温度安定性）、図 20（p H 安定性）に示した。本酵素の温度安定性は約 15 40 °C までで、p H 安定性は約 4.5 乃至 9.0 であった。

20 本酵素活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度 1 mM の各種金属塩存在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表 8 に示す。

表 8

金属イオン	相対活性 (%)	金属イオン	相対活性 (%)
無添加	100	Hg <sup>2+</sup>	2
Zn <sup>2+</sup>	83	Ba <sup>2+</sup>	90
Mg <sup>2+</sup>	91	Sr <sup>2+</sup>	93
Ca <sup>2+</sup>	91	Pb <sup>2+</sup>	74
Co <sup>2+</sup>	89	Fe <sup>2+</sup>	104
Cu <sup>2+</sup>	56	Fe <sup>3+</sup>	88
Ni <sup>2+</sup>	89	Mn <sup>2+</sup>	93
Al <sup>3+</sup>	89	EDTA	98

表8の結果から明らかなように、本酵素活性は、Hg<sup>2+</sup>で著しく阻害され、Cu<sup>2+</sup>で阻害された。また、Ca<sup>2+</sup>で活性化されないことも、EDTAで阻害されないこともわかった。

- 5      本酵素のN末端アミノ酸配列を、『プロテインシーケンサー モデル473A』（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて分析したところ、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列のイソロイシンーアスパラギン酸ーグリシンーバリンーチロシンーヒスチジンーアラニンープロリンーチロシンーグリシンのN末端アミノ酸配列を
- 10    有していることがわかった。このN末端アミノ酸配列結果を実験5-2のバチルス グロビスポルス C9由来の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素のN末端配列と比較して、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の共通するN末端アミノ酸配列は、配列表における配列番号4に示すアミノ酸配列のイソロイシンーアスパラギン酸ーグリシンーバリンーチロ
- 15    シンーヒスチジンーアラニンープロリンのN末端アミノ酸配列であることが判明した。

実験9  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素のアミノ酸配列

実験9-1  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の内部部分アミノ酸配列



実験 7-2 の方法で得られた精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品の一部を 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) に対して、透析した後、同緩衝液で約 1 mg/ml の濃度になるように希釈した。この試料液 (1 ml) に 1.0  $\mu$ g のトリプシン (和光純薬株式会社販売) を加え、30  $^{\circ}$ C、22 時間反応させることによりペプチド化した。生成したペプチドを単離するため、逆相 HPLC を行なった。マイクロボンドパック C18 カラム (直径 2.1 mm  $\times$  長さ 150 mm、ウオーターズ社製) を用い、流速 0.9 ml/分、室温で 0.1% トリフルオロ酢酸-8% アセトニトリル溶液から 0.1% トリフルオロ酢酸-40% アセトニトリル溶液の 120 分間のリニアグラジエントの条件で行なった。カラムから溶出したペプチドは、波長 210 nm の吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離した 3 ペプチド [P64 (保持時間約 64 分)、P88 (保持時間約 88 分)、P99 (保持時間約 99 分)] を分取し、それぞれを真空乾燥した後、200  $\mu$ l の 0.1% トリフルオロ酢酸-50% アセトニトリル溶液に溶解した。それらペプチド試料をプロテインシーケンサーに供し、それぞれ 8 残基までアミノ酸配列を分析したところ、配列表における配列番号 5 乃至 7 に示すアミノ酸配列が得られた。得られた内部部分アミノ酸配列を表 9 に示す。

20 表 9

ペプチド名	内 部 部 分 ア ミ ノ 酸 配 列
P 6 4	アスパラギン酸-アラニン-セリン-アラニン-アスパラギン-バリン-スレオニン-スレオニン
P 8 8	トリプトファン-セリン-ロイシン-グリシン-フェニルアラニン-メチオニン-アスパラギン-フェニルアラニン
P 9 9	アスパラギン-チロシン-スレオニン-アスパラギン酸-アラニン-トリプトファン-メチオニン-フェニルアラニン

実験 9 - 2  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の内部部分アミノ酸配列

実験 7 - 3 の方法で得られた精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品の一部を 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) に対して、透析した後、同緩衝液で約 1 mg/ml の濃度になるように希釈した。

- 5 この試料液 (1 ml) に 10  $\mu$ g のリジルエンドペプチダーゼ (和光純薬株式会社販売) を加え、30°C、22 時間反応させることによりペプチド化した。生成したペプチドを単離するため、逆相 HPLC を行なった。マイクロボンドパック C18 カラム (直径 2.1 mm  $\times$  長さ 150 mm、ウオーターズ社製) を用い、流速 0.9 ml/分、室温で 0.1% トリフルオロ酢酸 - 8% アセトニトリル溶液から 0.1% トリフルオロ酢酸 - 40% アセトニトリル溶液の 120 分間のリニアグラジエントの条件で行なった。カラムから溶出したペプチドは、波長 210 nm の吸光度を測定することにより検出した。他のペ
- 10 プチドとよく分離した 3 ペプチド [P22 (保持時間約 22 分)、P63 (保持時間約 63 分)、P71 (保持時間約 71 分)] を分取し、それぞれを真空乾燥した後、200  $\mu$ l の 0.1% トリフルオロ酢酸 - 50% アセトニトリル溶液に溶解した。それらペプチド試料をプロテインシーケンサーに供し、それぞれ 8 残基までアミノ酸配列を分析したところ、配列表における配列番号 8 乃至 10 に示すアミノ酸配列
- 15 が得られた。得られた内部部分アミノ酸配列を表 10 に示す。

表 10

ペプチド名	内 部 部 分 ア ミ ノ 酸 配 列
P22	グリシン-アスパラギン-グルタミン酸-メチオニン-アルギニン-アスパラギン-グルタミン-チロシン
P63	イソロイシン-スレオニン-スレオニン-トリプトファン-プロリン-イソロイシン-グルタミン酸-セリン
P71	トリプトファン-アラニン-フェニルアラニン-グリシン-ロイシン-トリプトファン-メチオニン-セリン

## 実験 10 各種糖質への作用

各種糖質を用いて、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の基質になりうるかどうかの試験をした。マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオース、イソマルトース、イソマルトトリオース、パノース、イソパノース、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース、コージビオース、ニゲロース、ネオトレハロース、セロビオース、ゲンチビオース、マルチトール、マルトトリイトール、ラクトース、スクロース、エルロース、セラギノース、マルトシルグルコシド、イソマルトシルグルコシドを含む溶液を調製した。

これらの溶液に、実験 4-2 の方法で得たバチルス グロビスポルス C9 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品、又は実験 7-2 の方法で得たバチルス グロビスポルス C11 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を基質固形物 15 グラム当たりそれぞれ 2 単位ずつ加え、基質濃度を 2 w/v % になるように調整し、これを 30℃、pH 6.0 で 24 時間作用させた。酵素反応前後の反応液を、実験 1 記載の TLC 法で分析し、それぞれの糖質に対する酵素作用の有無を確認した。結果を表 11 に示す。

表 11

基 質	酵素作用		基 質	酵素作用	
	C9酵素	C11酵素		C9酵素	C11酵素
マルトース	+	+	ニゲロース	+	+
マルトトリオース	++	++	ネオトレハロース	+	+
マルトテトラオース	+++	+++	セロビオース	-	-
マルトペンタオース	+++	+++	ゲンチビオース	-	-
マルトヘキサオース	+++	+++	マルチトール	-	-
マルトヘプタオース	+++	+++	マルトトリイトール	+	+
イソマルトース	-	-	ラクトース	-	-
イソマルトトリオース	-	-	スクロース	-	-
パノース	-	-	エルロース	+	+
イソパノース	++	++	セラギノース	-	-
$\alpha$ , $\alpha$ -トレハロース	-	-	マルトシルグルコシド	++	++
コージビオース	+	+	イソマルトシルグルコシド	-	-

注) 酵素反応前後で、「-」は、変化無しを示し、

「+」は、基質のスポットが僅かに減少し、他の生成物が認められるを示し、

「++」は、基質のスポットがかなり減少し、他の生成物が認められるを示し、

「+++」は、基質のスポットがほとんど消失し、他の生成物が認められるを示す。

表 11 の結果から明らかなように、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、試験した多種の糖質のうち、グルコース重合度 3 以上で、非還元末端にマルトース構造を有する糖質によく作用することが判明した。また、グルコース重合度が 2 の糖質では、マルトース、コージビオース、ニゲロース、ネオトレハロース、マルトトリイトール、エルロースにも僅かに作用することが判明した。

#### 実験 11 マルトオリゴ糖からの生成物

##### 実験 11-1 生成物の調製

- 10 濃度 1 % のマルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオースのそれぞれ水溶液に実験 7-2 の方法で得た精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を、それぞれ固形物 1 グラム当たり 2 単位 (マルトース及びマルトトリオース)、0.2 単位 (マ

ルトテトラオース)、0.1単位(マルトペンタオース)加え、35℃、  
pH 6.0で8時間作用させ、100℃で10分間保持して反応を停  
止した。その酵素反応液の糖組成を、HPLC法を用いて測定した。  
HPLCは、『YMC Pack ODS-AQ303』カラム(株  
5 式会社ワイ・エム・シー製造)を用いカラム温度40℃、流速0.5  
ml/min水の条件で行い、検出は示差屈折計『RI-8012』  
(東ソー株式会社製造)を用いて行なった。その結果を表12に示す。

表 1 2

反応で生成した糖質の種類	基 質			
	マルトース	マルトトリオース	マルトテトラオース	マルトペンタオース
グルコース	8.5	0.1	0.0	0.0
マルトース	78.0	17.9	0.3	0.0
マルトトリオース	0.8	45.3	22.7	1.9
マルトテトラオース	0.0	1.8	35.1	19.2
マルトペンタオース	0.0	0.0	3.5	34.4
マルトヘキサオース	0.0	0.0	0.0	4.6
イソマルトース	0.5	0.0	0.0	0.0
グルコシルマルトース	8.2	1.2	0.0	0.0
グルコシルマルトトリオース	2.4	31.5	6.8	0.0
X	0.0	2.1	30.0	11.4
Y	0.0	0.0	1.4	26.8
Z	0.0	0.0	0.0	1.7
その他	0.6	0.1	0.2	0.0

表中の

グルコシルマルトースは、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコース (別名、 $6^2-O-\alpha$ -グルコシルマルトース、パノース) で、  
 グルコシルマルトトリオースは、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコース (別名、 $6^3-O-\alpha$ -グルコシルマルトトリオース) で、  
 Xは、実験11-2で記載の $\alpha$ -イソマルトシルグルコトリオース (別名、 $6^4-O-\alpha$ -グルコシルマルトテトラオース) で、  
 Yは、実験11-2で記載の $\alpha$ -イソマルトシルグルコテトラオース (別名、 $6^6-O-\alpha$ -グルコシルマルトペンタオース) で、  
 Zは、未同定の糖質である。

表 1 2 の結果から明らかなように、本酵素の作用の結果、基質マルトースからは、主にグルコースと  $\alpha$ -イソマルトシルグルコース（別名、 $6^2$ -O- $\alpha$ -グルコシルマルトース、パノース）とが生成し、基質マルトトリオースからは、主にマルトースと  $\alpha$ -イソマルトシルグルコース（別名、 $6^3$ -O- $\alpha$ -グルコシルマルトトリオース）とが生成し、少量ながらグルコース、マルトテトラオース、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコース（別名、 $6^2$ -O- $\alpha$ -グルコシルマルトース、パノース）、生成物 X が生成することが判明した。基質マルトテトラオースからは、主にマルトトリオースと生成物 X とが生成し、少量ながらマルトース、マルトペンタオース、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコース（別名、 $6^3$ -O- $\alpha$ -グルコシルマルトトリオース）、生成物 Y が生成することが判明した。基質マルトペンタオースからは、主にマルトテトラオースと生成物 Y とが生成し、少量ながらマルトトリオース、マルトヘキサオース、生成物 X、生成物 Z が生成することが判明した。

基質マルトテトラオースからの主生成物である生成物 X、並びに基質マルトペンタオースからの主生成物である生成物 Y の単離・精製を行った。分取用 HPLC カラム『YMC-Pack ODS-A R 355-15S-15 12A』（株式会社ワイエムシイ製）を用いて精製し、上記のマルトテトラオースからの反応物、マルトペンタオースからの反応物それぞれから、純度 99.9% 以上の生成物 X 標品を固形物収率約 8.3% で、純度 99.9% 以上の生成物 Y を固形物収率約 11.5% で単離した。

#### 実験 1 1 - 2 生成物の構造解析

実験 1 1 - 1 の方法で得た生成物 X 標品及び生成物 Y 標品を用いて、常法にしたがってメチル化分析と NMR 分析を行なった。メチル化分析の結果は表 1 3 にまとめた。NMR 分析の結果については、

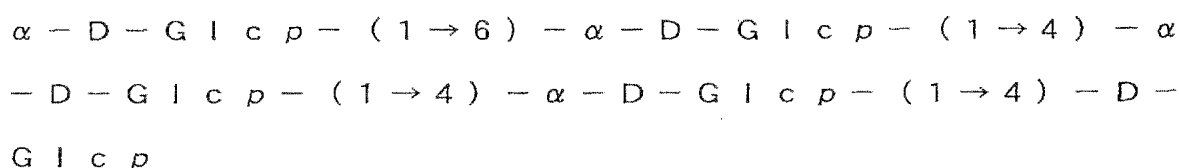
H-NMRスペクトルを図21（生成物X）、図22（生成物Y）に、  
<sup>13</sup>C-NMRスペクトル及び帰属を図23（生成物X）、図24（生成物Y）、表14にまとめた。

表13

分析メチル化物の種類	組成比	
	生成物X	生成物Y
2, 3, 4-トリメチル化物	1.00	1.00
2, 3, 6-トリメチル化物	3.05	3.98
2, 3, 4, 6-テトラメチル化物	0.82	0.85

これらの結果から、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素による  
 マルトテトラオースからの生成物Xは、マルトテトラオースの非還元  
 末端グルコースの6位水酸基にグルコース基が $\alpha$ 結合した5糖で、構  
 造式1で表わされる $\alpha$ -イソマルトシルマルトトリオース（別名、6  
 4-O- $\alpha$ -グルコシルマルトテトラオース）であることが判明した。

構造式1：



また、マルトペンタオースからの生成物Yは、マルトペンタオース  
 の非還元末端グルコースの6位水酸基にグルコシル基が $\alpha$ 結合した  
 6糖で、構造式2で表わされる $\alpha$ -イソマルトシルマルトテトラオー  
 ス（別名、6<sup>5</sup>-O- $\alpha$ -グルコシルマルトペンタオース）であるこ  
 とが判明した。

構造式2：

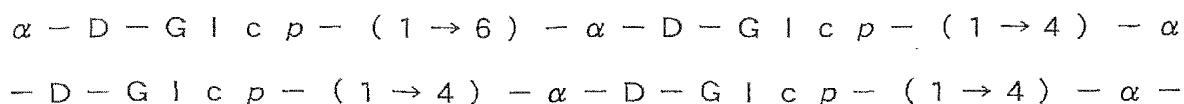






表 1 4

グルコース番号	炭素番号	NMR化学シフト値 (ppm)	
		生成物X	生成物Y
a	1a	100.8	100.8
	2a	74.2	74.2
	3a	75.8	75.7
	4a	72.2	72.2
	5a	74.5	74.5
	6a	63.2	63.1
b	1b	102.6	102.6
	2b	74.2	74.2
	3b	75.8	75.7
	4b	72.1	72.1
	5b	74.0	74.0
	6b	68.6	68.6
c	1c	102.3	102.3
	2c	74.2	74.2
	3c	76.0	76.0
	4c	79.6	79.5
	5c	73.9	73.9
	6c	63.2	63.1
d	1d	102.2	102.3
	2d	74.0 ( $\alpha$ ), 74.4 ( $\beta$ )	74.2
	3d	76.0	76.0
	4d	79.8	79.5
	5d	73.9	73.9
	6d	63.2	63.1
e	1e	94.6 ( $\alpha$ ), 98.5 ( $\beta$ )	102.1
	2e	74.2 ( $\alpha$ ), 76.7 ( $\beta$ )	74.0 ( $\alpha$ ), 74.4 ( $\beta$ )
	3e	75.9 ( $\alpha$ ), 78.9 ( $\beta$ )	76.0
	4e	79.6 ( $\alpha$ ), 79.4 ( $\beta$ )	79.8
	5e	72.6 ( $\alpha$ ), 77.2 ( $\beta$ )	73.9
	6e	63.4 ( $\alpha$ ), 63.4 ( $\beta$ )	63.1
f	1f		94.6 ( $\alpha$ ), 98.5 ( $\beta$ )
	2f		74.2 ( $\alpha$ ), 76.7 ( $\beta$ )
	3f		76.0 ( $\alpha$ ), 78.9 ( $\beta$ )
	4f		79.6 ( $\alpha$ ), 79.5 ( $\beta$ )
	5f		72.6 ( $\alpha$ ), 77.2 ( $\beta$ )
	6f		63.3 ( $\alpha$ ), 63.3 ( $\beta$ )

以上のことから、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素のマルト

オリゴ糖に対する作用は以下のように判断された。

(1) 本酵素は、基質として、 $\alpha$ -1, 4結合からなるグルコース重合度が2以上のマルトオリゴ糖に作用し、その非還元性末端のグルコシル残基を他の分子の非還元性末端のグルコシル残基の6位に転  
5 移する作用を有する分子間の6-グルコシル転移を触媒して、非還元末端に6-O- $\alpha$ -グルコシル基を有するグルコース重合度が1増加した $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質（別名、6-O- $\alpha$ -グルコシルマルトオリゴ糖）と、グルコース重合度が1減じたマルトオリゴ糖とを生成する。

10 (2) 本酵素は、4-グルコシル転移も僅かに触媒し、マルトオリゴ糖から、グルコース重合度が1増加したマルトオリゴ糖と、グルコース重合度が1減じたマルトオリゴ糖とを僅かに生成する。

#### 実験12 還元力生成試験

$\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素が還元力生成能を有するかどうかを調べるため、以下の試験を行った。濃度1%のマルトテトラオース水溶液に実験4-2の方法で得たバチルス グロビスポルス C9由来の精製 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び実験7-2の方法で得たバチルス グロビスポルス C11由来の精製 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を、基質固形物1グラム当  
15 たり0.25単位加え、35℃、pH6.0で作用させ、その反応液の一部を経時的に採り、100℃で10分間保持して反応を停止し、反応液の還元力を測定した。即ち、その酵素反応前後の溶液の還元糖量をソモギー・ネルソン法で測定し、また、同時にその酵素反応前後の溶液の全糖量をアントロン硫酸法で測定し、還元力生成率(%)は  
20 以下の計算式を用いて算出した。

数1

計算式：

$$\text{還元力生成率 (\%)} = \left( \frac{\text{反応後の還元糖量}}{\text{反応後の全糖量}} \right) - \left( \frac{\text{反応前の還元糖量}}{\text{反応前の全糖量}} \right) \times 100$$

結果を表 1 5 に示す。

表 1 5

反応時間 (時間)	還元力生成率 (%)	
	C 9 酵素	C 1 1 酵素
0	0 . 0	0 . 0
1	0 . 0	0 . 1
2	0 . 1	0 . 0
4	0 . 1	0 . 1
8	0 . 0	0 . 0

表 1 5 の結果から明らかなように、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、マルトテトラオースを基質として作用させると、反応物の還元力を実質的に増加しないこと、即ち、当該  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は加水分解作用を示さないか若しくは検出できないほど僅かなものであることが判明した。

### 実験 1 3 デキストラン生成試験

$\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素がデキストラン生成作用を有するかどうかを調べるため、『バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー (Bioscience Biotechnology and Biochemistry)』、第 5 6 巻、1 6 9 乃至 1 7 3 (1 9 9 2 年) に記載の方法に準じて試験

を行った。濃度 1 % のマルトテトラオース水溶液に実験 4 - 2 の方法で得た C 9 株由来の精製  $\alpha$  - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び実験 7 - 2 の方法で得たバチルス グロビスポルス C 1 1 株由来の精製  $\alpha$  - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を、基質固形物 1 グラム当たり 0 . 2 5 単位加え、3 5 °C、p H 6 . 0 で 4 時間及び 8 時間作用させた後、1 0 0 °C で 1 5 分間保持して反応を停止した。その酵素反応液の 5 0  $\mu$  l を遠心管に入れ、それに 3 倍量のエタノールを加え十分に攪拌した後、4 °C で 3 0 分間静置した。次いで、遠心分離 ( 1 5 , 0 0 0 r p m、5 分間 ) し、その上清を除去した後、1 m l の 7 5 % のエタノールを加え攪拌して洗浄した。再度、遠心分離してその上清を除き、真空乾燥した後、1 m l の脱イオン水を加え十分に攪拌した。その液中の全糖量 ( グルコース換算 ) をフェノール硫酸法で測定し、試験の全糖量とした。反応のブランクとして、1 0 0 °C で 1 0 分間熱処理し失活させたバチルス グロビスポルス C 9 由来又はバチルス グロビスポルス C 1 1 由来の精製  $\alpha$  - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を用いて同様に行い、ブランクの全糖量とした。デキストラン生成量は以下の計算式で計算した。

計算式：

$$\text{デキストラン生成量 (mg / ml)} = [(\text{試験の全糖量}) - (\text{ブランクの全糖量})] \times 20$$

結果を表 1 6 に示す。

表 1 6

反応時間 (時間)	生成デキストラン (mg/ml)	
	C 9 酵素	C 1 1 酵素
4	0. 0	0. 0
8	0. 0	0. 0

表 1 6 の結果から明らかなように、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素をマルトテトラオースに作用させてもデキストランを生成しないこと、つまり、当該  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、  
 5 デキストラン生成作用を実質的に有さないか、その生成量は検出限界以下であることが判明した。

#### 実験 1 4 転移受容体特異性

各種糖質を用いて、本酵素の転移受容体になりうるかどうかの試験をした。D-グルコース、D-キシロース、L-キシロース、D-ガラクトース、D-フラクトース、D-マンノース、D-アラビノース、  
 10 D-フコース、L-ソルボース、L-ラムノース、メチル- $\alpha$ -グルコシド、メチル- $\beta$ -グルコシド、N-アセチル-グルコサミン、ソルビトール、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース、イソマルトース、イソマルトリオース、セロビオース、ゲンチビオース、マルチトール、ラクトース、  
 15 スクロース、 $\alpha$ -サイクロデキストリン、 $\beta$ -サイクロデキストリン、 $\gamma$ -サイクロデキストリンの溶液を調製した。

これらの受容体溶液（濃度 1. 6 %）に、糖供与体として澱粉部分分解物『パインデックス # 1 0 0』（濃度 4 %）を加え、実験 4-2 の方法で得たバチルス グロビスポルス C 9 由来の精製  $\alpha$ -イソ  
 20 マルトシルグルコ糖質生成酵素標品又は実験 7-2 の方法で得たバチルス グロビスポルス C 1 1 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシルグ

ルコ糖質生成酵素標品を糖供与体固形物 1 グラム当たりそれぞれ 1  
単位ずつ加え、これを 30℃、pH 6.0 で 24 時間作用させた。酵  
素反応後の反応液を、受容体が単糖又は二糖の場合はガスクロマトグ  
ラフィー法（以下、「GLC 法」と略する。）で、受容体が三糖以上の  
5 場合は HPLC 法で分析し、それぞれの糖質が本酵素の転移受容体にな  
るかを確認した。なお、GLC において、GLC 装置は『GC-1  
6A』（株式会社島津製作所製）、カラムはジー・エル・サイエンス株  
式会社製『2%シリコンOV-17/クロモゾルブW』を充填したス  
テンレス製カラム（3mmφ×2m）、キャリアーガスは窒素ガスを  
10 流量 40ml/分で 160℃から 320℃まで 7.5℃/分の速度で  
昇温し、検出は水素炎イオン化検出器で分析した。HPLC では、H  
PLC の装置は東ソー株式会社製『CCPD』、カラムは『ODS-  
AQ-303』（株式会社ワイエムシー社製）、溶離液は水を流速 0.  
5ml/分で、検出は示差屈折計で分析した。結果を表 17 に示す。

15 表 17

糖 質	転移生成物		糖 質	転移生成物	
	C9酵素	C11酵素		C9酵素	C11酵素
D-グルコース	+	+	ソルビトール	-	-
D-キシロース	++	++	$\alpha$ , $\alpha$ -トレハロース	++	++
L-キシロース	++	++	イソマルトース	++	++
D-ガラクトース	+	+	イソマルトトリオース	++	++
D-フラクトース	+	+	セロビオース	++	++
D-マンノース	-	-	ゲンチビオース	++	++
D-アラビノース	±	±	マルチトール	++	++
D-フコース	+	+	ラクトース	++	++
L-ソルボース	+	+	スクロース	++	++
L-ラムノース	-	-	$\alpha$ -シクロデキストリン	-	-
メチル- $\alpha$ -グルコース	++	++	$\beta$ -シクロデキストリン	-	-
メチル- $\beta$ -グルコース	++	++	$\gamma$ -シクロデキストリン	-	-
N-アセチルグルコサミン	+	+			

表中の

「-」は、受容体への糖転移物が検出されなかったを示し、

「±」は、受容体への糖転移物が検出されたが、その生成量が1%未満であったを示し、

「+」は、受容体への糖転移物が10%未満であったを示し、

「++」は、受容体への糖転移物が10%以上であったを示す。

表17の結果から明らかなように、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、転移受容体として種々の糖質が利用でき、特に、D- / L-キシロース、メチル- $\alpha$ -グルコシド、メチル- $\beta$ -グルコシド、  
 5  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース、イソマルトース、イソマルトトリオース、セロビオース、ゲンチビオース、マルチトール、ラクトース及びスクロースによく転移し、次いで、D-グルコース、D-フラクトース、D-

ーフコース、Lーソルボース及びNーアセチルグルコサミンに転移し、  
更には、Dーアラビノースにも転移することが判明した。

以上に述べた $\alpha$ ーイソマルトシルグルコ糖質生成酵素の性質につ  
いて、先に報告されている6ーグルコシル転移作用を有する酵素、

5 『バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミスト  
リー (B i o s c i e n c e B i o t e c h n o l o g y a n d  
B i o c h e m i s t r y)』、第56巻、第169乃至173頁 (1  
992年) に記載のデキストリン・デキストラナーゼ及び『日本農芸  
化学会誌』、第37巻、第668乃至672頁 (1963年) に記載  
10 のトランスグルコシダーゼと比較した。その結果を表18にまとめた。

表 1 8

性 質	本発明の $\alpha$ ーイソマルトシル グルコ糖質生成 酵素		デキストリン・ デキストラナ ーゼ (対照)	トランスグル コシダーゼ (対照)
	C9 酵素	C11 酵素		
加水分解能	加水分解しない	加水分解しない	加水分解しない	主に加水分解する
デキストラン生成能	生成しない	生成しない	生成する	生成しない
至適pH	6.0-6.5	6.0	4.0-4.2	3.5
EDTAによる阻害	阻害される	阻害される	阻害されない	阻害されない

表 1 8 から明らかなように、 $\alpha$ ーイソマルトシルグルコ糖質生成酵  
素は、既知のデキストリン・デキストラナーゼやトランスグルコシダ  
15 ーゼとは全く異なる新規な理化学的性質を有することが判明した。

#### 実験 1 5 環状四糖の生成

各種糖質を用いて、 $\alpha$ ーイソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び $\alpha$   
ーイソマルトシル転移酵素の作用による環状四糖生成試験を行った。  
マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタ  
20 オース、アミロース、可溶性澱粉、澱粉部分分解物 (商品名『パイン  
デックス # 1 0 0』、松谷化学株式会社製) 又はグリコーゲン (カキ



由来、和光純薬株式会社販売)の溶液を調製した。

これらの水溶液(濃度0.5%)に、実験7-2の方法で得たバチルス グロビスポルス C11由来の精製 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を固形物1グラム当たり1単位と、実験7-3の方法で得たバチルス グロビスポルス C11由来の精製 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を固形物1グラム当たり10単位とを加え、これらを30℃、pH6.0で作用させた。作用条件は、以下の4つの系で行った。

(1)  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を24時間作用させた後、酵素を熱失活し、続いて、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を24時間作用させた後、酵素を熱失活させた。

(2)  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを同時に24時間作用させた後、酵素を熱失活させた。

(3)  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素のみを24時間作用させた後、酵素を熱失活させた。

(4)  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素のみを24時間作用させた後、酵素を熱失活させた。

これら熱失活させた反応液中の環状四糖の生成量を調べるために、実験1と同様の $\alpha$ -グルコシダーゼ・グルコアミラーゼ処理し、残存する還元性オリゴ糖を加水分解し、HPLC法で環状四糖を定量した。それらの結果を表19に示す。

表19

基 質	環状四糖生成量 (%)			
	$\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素作用の後、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を作用	$\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを 同時作用	$\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素のみの作用	$\alpha$ -イソマルトシル転移酵素のみの作用
マルトース	4. 0	4. 2	0. 0	0. 0
マルトトリオース	10. 2	12. 4	0. 0	0. 0
マルトテトラオース	11. 3	21. 5	0. 0	0. 0
マルトペンタオース	10. 5	37. 8	0. 0	0. 0
アミロース	3. 5	31. 6	0. 0	0. 0
可溶性澱粉	5. 1	38. 2	0. 0	0. 0
澱粉部分分解物	6. 8	63. 7	0. 0	0. 0
グリコーゲン	10. 2	86. 9	0. 0	0. 0

表 19 の結果から明らかなように、試験したいずれの糖質も、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素のみの作用及び $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素のみの作用では、環状四糖は全く生成しなかったのに対して、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を同時併用することにより環状四糖が生成した。その生成量は、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を作用させた後に $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を作用させた場合には、約 11 % 以下と比較的に低いのに対して、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを同時に作用させると、いずれの糖質でも環状四糖の生成量は向上し、特に、グリコーゲンでは約 87 % に増加し、澱粉部分分解物では約 64 % に増加することが判明した。

この $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素との同時併用における環状四糖の生成メカニズムは、両酵素の反応特性から以下のように推察される。

(1)  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、グリコーゲンや

澱粉部分分解物などの $\alpha-1, 4$ グルカン鎖の非還元末端グルコース基に作用し、そのグルコース基を他の $\alpha-1, 4$ グルカン鎖の非還元末端グルコース基の6位水酸基に分子間転移させ、非還元末端に $\alpha$ -イソマルトシル基を有する $\alpha-1, 4$ グルカン鎖が生成する。

- 5 (2)  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は、非還元末端にイソマルトシル基を有する $\alpha-1, 4$ グルカン鎖に作用し、そのイソマルトシル基を、他の非還元末端にイソマルトシル基を有する $\alpha-1, 4$ グルカン鎖の非還元末端グルコース基の3位水酸基に分子間転移させ、非還元末端にイソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を有する $\alpha-1,$   
10 4グルカン鎖が生成する。

- (3) 続いて、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は、その非還元末端にイソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を有する $\alpha-1, 4$ グルカン鎖に作用し、分子内転移作用によってイソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を $\alpha-1, 4$ グルカン鎖から切り離し、環状化して  
15 環状四糖が生成する。

- (4) 切り離された $\alpha-1, 4$ グルカン鎖は、再度、(1)から(3)の反応を受けることによって、更に、環状四糖が生成する。 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素との同時併用で、上記のように両酵素が繰り返し作用し、環状四糖の生成  
20 量が増加すると推察された。

#### 実験 16 澱粉液化程度の影響

- とうもろこし澱粉を濃度 15% 澱粉乳とし、これに炭酸カルシウムを 0.1% 加えて pH 6.0 に調整し、 $\alpha$ -アミラーゼ（商品名『ターマミール 60L』(ノボ社製)を澱粉 1 グラム当たり 0.2 乃至 2.0% を加え、95℃ で 10 分間反応させ、次いで、120℃ で 20 分  
25 間オートクレーブし、約 35℃ に急冷して、DE 3.2 乃至 20.5

の液化溶液を得、これに、実験 7-2 の方法で得たバチルス グロビ  
 スポルス C 1 1 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵  
 素標品を固形物 1 グラム当たり 2 単位と、実験 7-3 の方法で得たバ  
 チルス グロビスポルス C 1 1 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシル転  
 5 移酵素標品を固形物 1 グラム当たり 20 単位とを加え、35℃で24時  
 間反応させた。100℃で15分間熱処理して酵素を失活させた。続  
 いて、実験 1 と同様に  $\alpha$ -グルコシダーゼ及びグルコアミラーゼを用  
 いて処理し、残存する還元性オリゴ糖を加水分解し、HPLC法で環  
 状四糖を定量した。それらの結果を表 20 に示す。

10 表 20

$\alpha$ -アミラーゼ使用量 澱粉当り (%)	D E	環状四糖生成率 (%)
0.2	3.2	54.5
0.4	4.8	50.5
0.6	7.8	44.1
1.0	12.5	39.8
1.5	17.3	34.4
2.0	20.5	30.8

表 20 の結果から明らかなように、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質  
 生成酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とによる環状四糖の生成は、  
 澱粉の液化の程度で影響を受け、液化の程度が低いほど、即ち、D E  
 15 が低値であるほど、澱粉からの環状四糖の生成率は高く、逆に、液化  
 の程度が高いほど、即ち、D E が高値であるほど、澱粉からの環状四  
 糖の生成率が低いことが判明した。具体的には、澱粉の部分分解の程  
 度は約 20 以下、望ましくは、D E 約 12 以下、更に望ましくは、D  
 E 約 5 以下が適していることが判明した。

20 実験 17 澱粉部分分解物濃度の影響

澱粉部分分解物『パインデックス # 1 0 0』(D E 約 2 乃至 5) の最終濃度 0. 5 乃至 4 0 % の水溶液を調製し、それぞれに、実験 7 - 2 の方法で得たバチルス グロビスポルス C 1 1 由来の精製  $\alpha$  - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を固形物 1 グラム当たり 1 5 単位と、実験 7 - 3 の方法で得たバチルス グロビスポルス C 1 1 由来の精製  $\alpha$  - イソマルトシル転移酵素標品を固形物 1 グラム当たり 1 0 単位加え、両酵素を同時併用して 3 0 °C、p H 6. 0 で 4 8 時間作用させた後、1 0 0 °C で 1 5 分間熱処理して酵素を失活させた。続いて、実験 1 と同様に  $\alpha$  - グルコシダーゼ及びグルコアミラーゼを用いて処理し、残存する還元性オリゴ糖を加水分解し、H P L C 法で環状四糖を定量した。それらの結果を表 1 8 に示す。

表 2 1

パインデックス濃度 (%)	環状四糖生成量 (%)
0. 5	6 3. 6
2. 5	6 2. 0
5	6 0. 4
1 0	5 7. 3
1 5	5 4. 6
2 0	5 1. 3
3 0	4 5. 9
4 0	3 9. 5

表 2 1 の結果から明らかなように、澱粉部分分解物の濃度が 0. 5 % の低濃度では、環状四糖の生成量は約 6 4 % であるのに対し、濃

度 40 % の高濃度では、環状四糖の生成量は約 40 % と、基質である澱粉部分分解物の濃度に依存して環状四糖の生成量が変わることが判明した。この結果から、環状四糖の生成量は、澱粉部分分解物が低濃度であるほど高まる傾向にあることが判明した。

5 実験 18 シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ添加効果

- 澱粉部分分解物『パインデックス # 100』水溶液（濃度 15 %）を調製し、実験 7-2 の方法で得たバチルス グロビスポルス C11 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を固形物 1 グラム当たり 1 単位と、実験 7-3 の方法で得た C11 株由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を固形物 1 グラム当たり 10 単位と、バチルス・ステアロサーモフィルス由来シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ（CGTase）を固形物 1 グラム当たり 0 乃至 0.5 単位加え、両酵素を同時併用して 30 °C、pH 6.0 で 48 時間作用させた後、100 °C で 15 分間熱処理して酵素を失活させた。
- 15 続いて、実験 1 と同様に  $\alpha$ -グルコシダーゼ及びグルコアミラーゼを用いて処理し、残存する還元性オリゴ糖を加水分解し、HPLC 法で環状四糖を定量した。それらの結果を表 2.2 に示す。

表 2.2

CGTase 添加量(単位)	環状四糖生成量 (%)
0	54.6
2.5	60.1
5	63.1
10	65.2

- 20 表 2.2 の結果から明らかなように、CGTase を添加することに

よって、環状四糖の生成量が増加することが判明した。

#### 実験 19 環状四糖の調製

トウモロコシ由来フィトグリコーゲン（キューピー株式会社製）の水溶液（約 100 l）を濃度 4 w / v %、pH 6.0、温度 30℃に調整した後、実験 7-2 の方法で得た精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を固形物 1 グラム当たり 1 単位と、実験 7-3 の方法で得た精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を固形物 1 グラム当たり 10 単位加え、48 時間作用させた後、100℃で 10 分間熱処理して酵素を失活させた。この反応液の一部を採り、HPLC で環状四糖生成量を調べたところ、糖組成として約 84 % であった。この反応液を pH 5.0、温度 45℃に調整した後、実験 1 と同様に  $\alpha$ -グルコシダーゼ及びグルコアミラーゼを用いて処理し、残存する還元性オリゴ糖などを加水分解し、さらに、水酸化ナトリウムで pH を 5.8 に調整し温度 90℃で 1 時間保持して、酵素を失活させ、不溶物を濾過して除去した。この濾液を逆浸透膜を用いて固形分濃度約 16 % まで濃縮した後、常法にしたがって脱色、脱塩、濾過、濃縮したところ、固形分約 3,700 g を含む糖液約 6.2 kg を得た。

得られた糖液を、オルガノ製イオン交換樹脂『アンバーライト CR-1310 (Na 型)』を充填したカラム（ゲル量約 225 l）に供し、カラム温度 60℃で流速約 45 l / h の条件でクロマト分離を行った。溶出液の糖組成を実験 1 に記載の HPLC 法でモニターし、環状四糖の純度が 98 % 以上の画分を回収し、常法にしたがって脱塩、脱色、濾過、濃縮したところ、固形分約 2,500 g を含む糖液約 7.5 kg を得た。得られた糖液の糖組成を HPLC 法で測定したところ、環状四糖の純度は約 99.5 % であった。

#### 実験 20 環状四糖の水溶液からの結晶化

実験 19 の方法で得られた純度約 98% 以上の環状四糖画分をエバポレーターで固形物濃度約 50% に濃縮した後、この濃縮糖液約 5 kg を円筒状のプラスチック容器に入れ、緩やかに回転させながら約 20 時間で温度を 65℃ から 20℃ まで降下させることにより晶析  
5 させたところ、白色の結晶状粉末が得られた。その顕微鏡写真の 1 例を図 25 に示す。続いて、遠心濾過器を用いて分離し結晶状物を湿重量として 1,360 g を回収した。さらに、60℃ で 3 時間乾燥して環状四糖結晶状粉末を 1,170 g 得た。得られた結晶粉末の糖組成を HPLC 法で測定したところ、環状四糖の純度は 99.9% 以上と  
10 極めて高純度であった。

この環状四糖の結晶状粉末を粉末 X 線回折法で解析したところ、図 26 に示すように、主な回折角 ( $2\theta$ ) として 10.1°、15.2°、20.3° 及び 25.5° を特徴とする回折スペクトルが得られた。また、この結晶状粉末の水分をカール・フィッシャー法で測定したと  
15 ころ、水分は 13.0% であることがわかり、環状四糖 1 分子当たり 5 乃至 6 分子の水を含む結晶であることが判明した。

さらに、この環状四糖の結晶粉末を熱重量測定したところ、図 27 に示す熱重量曲線が得られ、その重量変化と温度との関係から、温度 150℃ までの上昇で 4 乃至 5 分子の水に相当する重量減少が認め  
20 られ、続いて、温度 250℃ 付近で 1 分子の水に相当する重量減少が認められ、さらに、温度 280℃ 付近から環状四糖自体の熱分解と考えられる重量減少が観察された。これらのことから、5 乃至 6 含水結晶環状四糖は、常圧において、温度を 150℃ まで上昇させることにより結晶分子当たり 4 乃至 5 分子の水が離脱して 1 分子の水を含む  
25 結晶になり、さらに温度 250℃ までに 1 分子の水が結晶から離脱して無水結晶になることが判明した。



## 実験 2 1 1 含水結晶環状四糖への変換

実験 2 0 の方法で得られる 5 乃至 6 含水結晶環状四糖粉末をガラス容器に入れ、予め温度 1 4 0 °C に保温したオイルバス中にそのガラス容器を 3 0 分間保持した。得られた環状四糖粉末を粉末 X 線回折法  
5 で解析したところ、熱処理前の 5 乃至 6 含水結晶の粉末 X 線回折とは全く異なり、図 2 8 に示すように、主な回折角 ( $2\theta$ ) として、8. 3 °、1 6. 6 °、1 7. 0 ° 及び 1 8. 2 ° を特徴とする回折スペクトルが得られた。また、この結晶状粉末の水分をカール・フィッシャー法で測定したところ、水分が約 2. 7 % であることがわかり、環  
10 状四糖 1 分子当たり 1 分子の水を含むことが判明した。さらに、この結晶粉末を熱重量測定したところ、図 2 9 に示す熱重量曲線が得られ、その重量変化と温度との関係から、温度 2 7 0 °C 付近で 1 分子の水に相当する重量減少が認められ、さらに、温度 2 9 0 °C 付近から環状四糖自体の熱分解と考えられる重量減少が観察された。これらのことから、この環状四糖結晶状物は 1 含水結晶であることが判明した。  
15

## 実験 2 2 無水結晶への変換

実験 2 0 の方法で得られる 5 乃至 6 含水結晶環状四糖粉末を温度 4 0 °C 乃至 1 2 0 °C でそれぞれ 1 6 時間真空乾燥した。得られた環状四糖粉末の水分をカール・フィッシャー法で測定したところ、真空乾燥温度 4 0 °C の場合は水分が約 4. 2 % であり、真空乾燥温度 1 2  
20 0 °C の場合は水分が約 0. 2 % で、実質的に無水であることが判明した。これら真空乾燥した環状四糖粉末を粉末 X 線回折法で解析したところ、真空乾燥前の 5 乃至 6 含水結晶の粉末 X 線回折及び 1 含水結晶のものとは全く異なり、図 3 0 (真空乾燥温度 4 0 °C)、図 3 1 (真空乾燥温度 1 2 0 °C) に示すように、主な回折角 ( $2\theta$ ) として、1  
25 0. 8 °、1 4. 7 °、1 5. 0 °、1 5. 7 ° 及び 2 1. 5 ° を特

徴とする回折スペクトルが得られた。両回折スペクトル間でのピーク強度の強弱は認められるものの、基本的にピークの回折角度は同一で、結晶学的に同一無水結晶と推察された。また、回折スペクトルのベースラインは山状を呈し、真空乾燥前の5乃至6含水結晶環状四糖のもの及び1含水結晶のものと比べ結晶化度が低下しており、非結晶状態の環状四糖が存在していることが判明した。このことから、真空乾燥40℃の場合の水分を約4.2%含む環状四糖粉末は、その水分を含む無水非晶質環状四糖と、無水結晶環状四糖とが混在する粉末と推察された。以上のことから、5乃至6含水結晶環状四糖粉末を真空乾燥することにより、5乃至6含水結晶は水分子を失い、無水非晶質と無水結晶に変換することがわかった。なお、水分0.2%の無水結晶環状四糖粉末について、実験20と同様に熱重量分析したところ、図32に示すように、温度270℃付近から環状四糖の熱分解と考えられる重量減少のみが観察された。

#### 15 実験23 環状四糖の水に対する飽和濃度

温度10乃至90℃での水に対する環状四糖の飽和濃度を調べるため、密栓付きガラス製容器に水10mlを入れ、それに実験20の方法で得られる5乃至6含水結晶環状四糖を、各温度で完全に溶解する量以上の量を加えた後、ガラス容器を密封し、飽和に達するまで温度10乃至90℃で保温しながら2日間攪拌した。それぞれの温度の環状四糖飽和溶液を精密濾過して溶けていない環状四糖を除いた後、その濾液の水分を乾燥減量法で調べ、各温度での飽和濃度を求めた。結果を表23に示す。

表23

温度 (°C)	飽和濃度 (%)
10	30.3
30	34.2
50	42.6
70	53.0
90	70.5

#### 実験 2 4 熱安定性

実験 2 0 の方法で得られる 5 乃至 6 含水結晶環状四糖を水に溶解し濃度 1 0 w / v % の環状四糖水溶液を調製し、その溶液 8 m l をガラス製試験管に採り、密封した後、1 2 0 °C で 3 0 乃至 9 0 分間加熱した。放冷後、それら溶液の着色度の測定と、H P L C 法による純度測定を行った。着色度は、4 8 0 n m における 1 c m セルでの吸光度により評価した。結果は表 2 4 に示す。

表 2 4

加熱時間 (分)	着色度 (A 4 8 0 n m)	純度 (%)
0	0.00	100
30	0.00	100
60	0.00	100
90	0.00	100

10

表 2 4 の結果から明らかなように、環状四糖水溶液は 1 2 0 °C の高温加熱でも着色はなく、糖組成の純度の低下もなく、環状四糖は熱に対して安定な糖質であることが判明した。

## 実験 2 5 p H 安定性

実験 2 0 の方法で得られる 5 乃至 6 含水結晶環状四糖を各種の緩衝液（2 0 m M）に溶解し、環状四糖を濃度 4 w / v %、p H を 2 乃至 1 0 に調整した環状四糖溶液を調製した。それぞれの溶液 8 m l を  
 5 ガラス製試験管に採り、密封した後、1 0 0 °C で 2 4 時間加熱した。放冷後、それら溶液の着色度の測定と、H P L C 法による純度測定を行った。着色度は、4 8 0 n m における 1 c m セルでの吸光度により評価した。結果は表 2 5 に示す。

表 2 5

pH(緩衝液の種類)	着色度 (A <sub>480nm</sub> )	純度 (%)
2.0 (酢酸)	0.00	93
3.0 (酢酸)	0.00	100
4.0 (酢酸)	0.00	100
5.0 (酢酸)	0.00	100
6.0 (トリス-塩酸)	0.00	100
7.0 (トリス-塩酸)	0.00	100
8.0 (トリス-塩酸)	0.00	100
9.0 (アンモニウム)	0.00	100
10.0 (アンモニウム)	0.00	100

10

表 2 5 の結果から明らかなように、環状四糖水溶液は 1 2 0 °C の高温で 2 4 時間加熱しても、p H 2 乃至 1 0 の広範囲で着色はなく、p H 2 において糖組成の純度は僅かに低下するものの、p H 3 乃至 1 0 の範囲では全く糖組成の純度は低下せず、環状四糖は広い p H 範囲、  
 15 換言すれば、p H 3 乃至 5 の酸性側、p H 6 乃至 8 の中性側、p H 9 乃至 1 0 のアルカリ側で煮沸しても極めて安定な糖質であることが判明した。

## 実験 2 6 アミノカルボニル反応

実験 2 0 の方法で得られる 5 乃至 6 含水結晶環状四糖を水に溶解し、さらに、それに市販試薬特級のグリシンとリン酸緩衝液を加え、5 0 m M リン酸緩衝液で p H 7 . 0 に調整した 1 w / v % グリシンを含む 1 0 w / v % 環状四糖溶液を調製した。その溶液 4 m l をガラス製試験管に採り、密封した後、1 0 0 °C で 3 0 乃至 9 0 分間加熱した。室内で放冷後、それらの着色度を測定しアミノカルボニル反応性を調べた。着色度は、4 8 0 n m における 1 c m セルでの吸光度により評価した。結果を表 2 6 に示す。

10 表 2 6

加熱時間 (分)	着色度 (A <sub>480nm</sub> )
0	0. 0 0
3 0	0. 0 0
6 0	0. 0 0
9 0	0. 0 0

表 2 6 の結果から明らかなように、環状四糖は、グリシン共存下で加熱しても着色はなく、グリシンとの褐変を引き起こさないこと、換言すれば、アミノカルボニル反応（メイラード反応とも言う）を起こしにくい安定な糖質であることが判明した。

## 実験 2 7 アミノカルボニル反応

実験 2 0 の方法で得られる 5 乃至 6 含水結晶環状四糖と市販ポリペプトン（日本製薬製）とを脱イオン水に溶かし、5 w / v % ポリペプトンを含む 1 0 w / v % 環状四糖溶液を調製した。その溶液 4 m l をガラス製試験管に採り、密封した後、1 2 0 °C で 3 0 乃至 9 0 分間加熱した。室内で放冷後、それらの着色度を測定しアミノカルボニル

反応性を調べた。同時に、ポリペプトンのみを含む溶液をブランクとして同様に加熱した。着色度は、480 nmにおける1 cmセルでの吸光度からブランクの吸光度を差し引いた値に基づいて評価した。結果を表27に示す。

5 表 2 7

加熱時間 (分)	着色度 ( $A_{480\text{nm}}$ )
0	0.00
30	0.00
60	0.00
90	0.00

表27の結果から明らかなように、環状四糖は、ポリペプトン共存下で加熱して、ポリペプトンとの褐変を引き起こさないこと、換言すれば、アミノカルボニル反応を起こしにくい安定な糖質であることが  
10 判明した。

#### 実験 2 8 包接作用

実験20の方法で得られる5乃至6含水結晶環状四糖を脱イオン水に溶かし、20%水溶液を調製した。その水溶液100 g当たり、メタノールは2 g、エタノールは3 g、酢酸は4.6 gを加えて包接  
15 を行なった。その後、それぞれを濾過し濾液を凍結乾燥し、未包接物を除去した。対照として、包接能を有することが知られている分枝シクロデキストリン（商品名『イソエリートP』、マルハ株式会社販売）を用いて同様に行なった。

凍結乾燥粉末中の包接物量を測定するために、それぞれの凍結乾燥  
20 粉末1 gを5 mlの水に溶かし、それに5 mlのジエチルエーテルを

加えて抽出を行ない、再度、抽出を繰り返した後、ジエチルエーテル中の抽出物をガスクロマトグラフィー法で定量した。結果を表 2 8 に示す。

表 2 8

包 接 物	包接量 (mg/g-凍結乾燥粉末)	
	環状四糖	イソエリート P (対照)
メ タ ノ ー ル	6. 7 1	2. 9 2
エ タ ノ ー ル	17. 2 6	8. 9 2
酢 酸	67. 7 4	30. 5 7

表 2 8 の結果から明らかなように、環状四糖は包接能を有しており、その包接能は、分枝サイクロデキストリンと比べ、重量当たり約 2 倍も高いことが判明した。

#### 実験 2 9 甘味度

10 実験 2 0 の方法で得られる 5 乃至 6 含水結晶環状四糖を脱イオン水に溶かし、固形物濃度 1 0 % 水溶液を調製し、この環状四糖 1 0 % 水溶液を基準とし、蔗糖（市販グラニュー糖）の濃度を変え、パネラー 5 名で官能試験を行なった。その結果、環状四糖の甘味度は、蔗糖の約 2 0 % であった。

#### 15 実験 3 0 消化性試験

実験 2 0 の方法で得られる 5 乃至 6 含水結晶環状四糖を用いて、『日本栄養食糧学会誌』、第 4 3 巻、第 2 3 乃至 2 9 頁（1 9 9 0 年）に記載の岡田等の方法に準じて、試験管内での唾液アミラーゼ、合成胃液、膵液アミラーゼ、小腸粘膜酵素による環状四糖の消化性を調べた。対照として、難消化性糖質として知られているマルチトールを用いて行なった。結果を表 2 9 に示す。

表 2 9

消 化 酵 素	消化酵素による分解率 (%)	
	環状四糖	マルチトール (対照)
唾液アミラーゼ	0. 0	0. 0
合成胃液	0. 0	0. 0
膵液アミラーゼ	0. 0	0. 0
小腸粘膜酵素	0. 7 4	4. 0

表 2 9 の結果から明らかなように、環状四糖は、唾液アミラーゼ、合成胃液、膵液アミラーゼで全く消化されず、小腸粘膜酵素によって僅かに消化されたが、その程度は 0. 7 4 % と低値であり、対照の難消化性糖質マルチトールの値と比較すると 1 / 5 以下であり、環状四糖が極めて消化されにくい糖質であることが判明した。

#### 実験 3 1 醗酵性試験

実験 2 0 の方法で得られる 5 乃至含水結晶環状四糖を用いて、『ジャーナル・オブ・ニュートリショナル・サイエンス・アンド・ビタミンロジー (Journal of Nutritional Science and Vitaminology)』、第 3 7 巻、第 5 2 9 乃至 5 4 4 頁 (1 9 9 1 年) に記載の Oku 等の方法に準じて、ラット盲腸内容物による環状四糖の発酵性を調べた。盲腸内容物は、ウィスター系雄ラットをエーテル麻酔下で屠殺し嫌氣的に採取し、4 倍量の 0. 1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液に懸濁したものをを用いた。環状四糖は盲腸内容物重量当たり約 7 % を添加し、添加直後及び 1 2 時間後に残存する環状四糖量はガスクロマトグラフィー法で定量した。その結果、添加直後の環状四糖濃度は盲腸内容物 g 当たり 6 8. 0 m g、1 2 時間後の環状四糖濃度は盲腸内容物 g 当たり 6 3. 0 m g であり、9 3 % が醗酵されず残存していることがわかり、環状四糖は極めて醗酵されにくい糖質であることが判明した。



### 実験 3 2 資化性試験

実験 2 0 の方法で得られる 5 乃至 6 含水結晶環状四糖を用いて、  
『腸内フローラと食物因子』、光岡知足編、学会出版センター（1 9  
8 4 年）に記載の方法に準じて、各種腸内細菌の資化性を調べた。即  
ち、予め培養しておいた新鮮な菌を、環状四糖を 0 . 5 % 添加した P  
Y F 培地 5 m l に約  $10^7$  C F U 接種し、嫌気条件下で 3 7 °C、4 日  
間培養した。対照として、資化されやすい糖質グルコースを用いて行  
なった。資化性の判定は、培養後の培養液の p H が、6 . 0 以上の場  
合、資化されない（－）とし、6 . 0 未満の場合、資化される（＋）  
とした。さらに、培養液中に残存する糖質をアンスロン法で測定し糖  
質の減少量を調べ、資化性の判定を確認した。結果を表 3 0 に示す。

表 3 0

腸内細菌株	資化性	
	環状四糖	グルコース(対照)
<i>Bacteroides vulgatus</i> JCM5826	—	+
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> JCM1275	—	+
<i>Clostridium perfringens</i> JCM3816	—	+
<i>Escherichia coli</i> IFO3301	—	+
<i>Eubacterium aerofaciens</i> ATCC25986	—	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM1132	—	+

表 30 の結果から明らかなように、環状四糖は、試験した腸内細菌

株のいずれにも資化されなく、対照のグルコースはいずれにも資化されることがわかり、環状四糖が腸内細菌に極めて資化されにくい糖質であることが判明した。

### 実験 3 3 急性毒性試験

5        マウスを使用して、実験 2 0 の方法で得られる 5 乃至 6 含水結晶環状四糖を経口投与して急性毒性試験を行なった。その結果、環状四糖は低毒性の物質で、投与可能な最大投与量においても死亡例は認められなかった。したがって、正確な値とはいえないが、その LD 5 0 値は、5 0 g / k g マウス体重以上であった。

10        以上の実験 3 0 乃至 3 3 の結果から、環状四糖は、経口摂取しても、消化、吸収されにくく、無カロリー乃至低カロリーの可食素材として、ダイエット甘味料、高甘味度甘味料の賦形剤、ダイエット飲食物の増粘剤、増量剤、賦形剤、更には、食物繊維、脂肪代替食品材料などとしての利用が期待できる。

15        実験 3 4    非還元性糖質による脱水量の大きさと脱水物品の粉末化の比較実験

      実験に用いた非還元性糖質は、無水結晶環状四糖、1 含水結晶環状四糖、無水非晶質環状四糖、5 乃至 6 含水結晶環状四糖、無水結晶  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース、無水非晶質  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース及び 2 含水結晶  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースである。5 乃至 6 含水結晶環状四糖は実験 2 0 の方法で調製した。無水結晶環状四糖、1 含水結晶環状四糖及び無水非晶質環状四糖は、それぞれ実施例 A-1、実施例 A-2 及び実施例 A-3 の方法で調製した。2 含水結晶  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースは市販のもの（商品名『トレハ』、株式会社林原商事販売）を用いた。無水結晶  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース及び無水非晶質  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースは市販の 2 含水結晶  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースから特開平 6-170221 号公

報参考例 1 及び参考例 3 に開示される方法で調製した。

水分含量約 77% のプレーンヨーグルト 4 重量部に、上記の糖質をそれぞれ 11 乃至 16 重量部を混合し得られる混合物をバットにとり、25℃で室内に 24 時間静置後、その混合物の状態変化を観察した。その判定は、十分に脱水して固化し、これを切削機にかけて粉末化が容易である場合を○、脱水がやや不十分で固化したけれども切削機による粉末化が困難である場合を△、脱水が不十分で固化しなかったことにより切削機にかけて粉末化することができなかった場合を×とした。結果は、表 3 1 に示す。

10 表 3 1

糖 質	水分含量 (使用前)	プレーンヨーグルト(水分含量約77%)4重量部に対する糖質の重量部					
		11重量部	12重量部	13重量部	14重量部	15重量部	16重量部
無水結晶 環状四糖	0.2%	×	△	○	○	○	○
1含水結晶 環状四糖	2.7%	×	×	×	△	○	○
無水非晶質 環状四糖	0.3%	×	△	○	○	○	○
5乃至6 含水結晶 環状四糖	13.0%	×	×	×	×	×	×
無水結晶 $\alpha$ , $\alpha$ - トレハロース	0.3%	×	×	×	×	△	○
無水非晶質 $\alpha$ , $\alpha$ - トレハロース	0.8%	×	×	×	×	△	○
2含水結晶 $\alpha$ , $\alpha$ - トレハロース	9.7%	×	×	×	×	×	×

表 3 1 の結果から、無水結晶環状四糖、1 含水結晶環状四糖及び無水非晶質環状四糖は、無水結晶  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース、無水非晶質  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースよりも少ない重量部で固化することができ、切削機

による粉末化が容易であることが判明した。また、得られる粉末の性状も優れていた。この結果から、無水結晶環状四糖、1含水結晶環状四糖及び無水非晶質環状四糖は脱水能を有する環状四糖で脱水剤として好適であり、とりわけ、無水結晶環状四糖及び無水非晶質環状四糖が脱水能に優れていることが判明した。

### 実験 3 5 脱水能を有する環状四糖による脱水作用

無水結晶環状四糖、1含水結晶環状四糖、無水非晶質環状四糖及び5乃至6含水結晶環状四糖の脱水作用、具体的には、糖質に対する吸水量とその経時変化について詳細に実験した。比較実験には糖質として無水結晶 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース、無水非晶質 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース及び2含水結晶トレハロースを用いた。実験は、実験34で述べた方法で調製したそれぞれの環状四糖及び $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースをふるい分けして粒径約100乃至150 $\mu$ mの粉末品とし、直径5cmのプラスチックシャーレにそれぞれ1gずつ採り、相対湿度60%又は75%に調整されたデシケーター内に入れ、25℃の雰囲気中に1週間放置し、経時的に糖質中に含まれる水分(%)をカール・フィッシャー法で測定した。結果は表32に示す。

表 3 2

糖 質	処理時の相 対湿度(%)	経 過 日 数				
		0	1	2	3	7
無水結晶環状四糖	60	0.2	10.2	10.3	10.3	10.4
	75	0.2	13.9	14.4	14.4	14.3
1含水結晶環状四糖	60	2.7	2.7	2.8	2.8	2.9
	75	2.7	14.0	14.0	14.1	14.1
無水非晶質環状四糖	60	0.3	13.7	13.8	13.9	14.1
	75	0.3	14.2	13.6	13.7	13.7
5乃至6含水結晶環状四糖	60	13.0	13.1	13.1	13.1	13.2
	75	13.0	13.1	13.1	13.1	13.1
無水結晶 $\alpha$ , $\alpha$ -トレハロース	60	—	—	—	—	—
	75	0.3	9.7	9.6	9.8	9.8
無水非晶質 $\alpha$ , $\alpha$ -トレハロース	60	—	—	—	—	—
	75	0.8	9.8	9.7	9.8	9.7
2含水結晶 $\alpha$ , $\alpha$ -トレハロース	60	—	—	—	—	—
	75	9.7	9.7	9.7	9.8	9.8

— : 試験せず

表 3 2 の結果から、相対湿度 6 0 % で放置した場合、1 含水結晶環状四糖及び 5 乃至 6 含水結晶環状四糖は 1 週間放置したのちもほとんど吸水は見られなかったが、無水結晶環状四糖及び無水非晶質環状四糖は 1 日目ではほぼ吸水量が飽和に達した。吸水量は、無水結晶環状四糖ではその重量の約 1 0 % であるのに対して、無水非晶質環状四糖ではその重量の約 1 4 % の値を示した。1 週間放置した後の各試料を粉末 X 線回折法で解析したところ、主な回折角はそれぞれ放置前の試料と同一の回折パターンを示し、結晶型に変化は見られなかった。相対湿度が 6 0 % 以下では、水分は取りこむが、結晶水として取り込まれるのではないことが明らかとなった。

一方、相対湿度 7 5 % で放置した場合、無水結晶環状四糖、1 含水結晶環状四糖及び無水非晶質環状四糖は、無水結晶 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース及び無水非晶質 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースを同様に、放置後 1 日ではほぼ吸水量が飽和に達した。この際の吸水量は、いずれの環状四糖も、その重量の約 1 4 % であるのに対し、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースはその重量の 1 0 % 弱であることから、環状四糖の方が脱水能としては優れて

いることが判明した。また、いずれの試料も粉末状態を維持し、吸湿によってべとついたり、流れたりする現象は見られなかった。更に、1週間放置後の無水結晶環状四糖、1含水結晶環状四糖及び無水非晶質環状四糖は、粉末X線回折法で解析したところ、主な回折角はそれぞれ放置前の試料と異なった回折パターンを示し、いずれも5乃至6含水結晶環状四糖の回折パターンに一致した。このことから、相対湿度が75%以上では、水分は結晶水として取り込まれて、5乃至6含水結晶に変換していることが明らかとなった。

上記のように優れた脱水能を有する本発明の環状四糖は、食品、医薬品、化粧品、これら原材料又は加工中間物などの含水物の強力な脱水剤として有利に利用できることが判明した。

実験 3 6 糊化澱粉の微生物汚染に対する無水結晶環状四糖と 5 乃至 6 含水結晶環状四糖の効果の比較

もち粉 4 重量部を水 6 重量部に溶いて、木杵に濡れ布きんを敷いたものに流し込み、これを 105℃で 10 分間蒸して糊化澱粉とする。これに実験 20 の方法で調製した 5 乃至 6 含水結晶環状四糖又は実施例 A-1 の方法で調製した無水結晶環状四糖 6 重量部をミキサーで混和し、均一になったら、更に水飴 2 重量部を加え十分に捏ねて成形し、更に 40℃の温風で 2 時間軽く乾燥して求肥を得た。

本品を25℃の室温に開放して放置したところ5乃至6含水結晶環状四糖を使用したものは、15日後に黒カビのコロニーの発生を見たが、無水結晶環状四糖を使用したものは、30日後においても微生物の汚染が見られなかった。

また30日後のものを切断して、その断面を観察したところ、無水結晶環状四糖を使用したものは、表層部がやや硬化して結晶が析出しているものの、内部は、製造直後と同様に半透明で適度な艶、粘度を

有していた。なお表層部の結晶は、X線回折図形より、無水結晶環状四糖が5乃至6含水結晶環状四糖に変換しているものであることが判明した。

この結果、脱水能を有する環状四糖は、糊化澱粉の脱水剤として作用し、微生物汚染を防止し、更に糊化澱粉の老化を防止することが判明した。この性質は、求肥、フラワーペーストなどの糊化澱粉を用いる各種製品に対して有利に利用できる。

以下、本発明の脱水能を有する環状四糖を実施例Aでその用途を実施例Bで具体的に述べる。

#### 10 実施例A-1 無水結晶環状四糖の製造方法

バチルス グロビスポルス C11 (FERM BP-7144) を実験6の方法に準じて、ファーメンターで48時間培養した。培養後、SF膜を用いて除菌濾過し、約18lの培養濾液を回収し、更に、その濾液をUF膜濃縮し、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を  
15 9.0単位/mlと $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を30.2単位/mlとを含む濃縮酵素液約1lを回収した。タピオカ澱粉を濃度約25%澱粉乳とし、これに $\alpha$ -アミラーゼ(商品名『ネオスピターゼ』、ナガセ生化学工業株式会社製)を澱粉固形物グラム当たり0.2%加え、85乃至90℃で約20分間反応させ、次いで120℃に20分間オートクレーブし、更に約35℃に急冷してDE約4の液化溶液を得、  
20 これに上記の方法で調製した $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを含む濃縮酵素液を澱粉固形物1グラム当たり0.25mlの割合になるように加え、更にシクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ(株式会社林原生物化学  
25 研究所製造)を澱粉固形物1グラム当たり10単位になるように加え、pH6.0、温度35℃で48時間反応させた。その反応液を95℃



で30分間保った後、pH5.0、温度50℃に調整した後、 $\alpha$ -グルコシダーゼ剤（商品名『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」』、天野製薬株式会社製）を固形物1グラム当たり300単位加え、24時間反応させ、更にグルコアミラーゼ剤（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社製）を固形物1グラム当たり30単位加え、17時間反応させ、その反応液を95℃に加熱し30分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法にしたがって、活性炭で脱色し、H型及びOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度60%の環状四糖含有シラップを原料澱粉固形物当たり収率約90%で得た。この環状四糖含有シラップを実験19に記載の方法にしたがって、強酸性カチオン交換樹脂（商品名『アンバーライトCR-1310（Na型）』、オルガノ株式会社製）を充填したカラム（ゲル量225l）に供し、カラム温度を60℃に維持しつつ、流速約45l/hの条件でクロマト分離を行った。溶出液の糖組成を実験1に記載のHPLC法でモニターし、環状四糖高含有画分を採取し、精製して、環状四糖高含有液を原料澱粉固形物当たり収率約21%で得た。本高含有液は、固形物当たり約98%の環状四糖を含有していた。本溶液を濃度約90%に濃縮した後、助晶缶にとり、種晶として無水結晶環状四糖約2%を加えて、120℃で16時間維持しつつ真空乾燥し、水分約0.2%の無水結晶環状四糖粉末を得た。本品は、強力な脱水能を有し、脱水剤として、含水物例えば食品、化学品、医薬品又はその原料、中間品などの含水物の脱水方法に有利に利用できる。

#### 実施例A-2 1 含水結晶環状四糖の製造方法

25      とうもろこし澱粉を濃度約20%の澱粉乳とし、これに炭酸カルシウム0.1%加え、pH6.5に調整し、 $\alpha$ -アミラーゼ（商品名『タ

ーマミール 60 L』、ノボ社製)を澱粉グラム当たり 0.3 重量% 加え、95℃で 15 分間反応させ、次いで 120℃に 20 分間オートクレーブし、更に約 35℃に急冷して DE 約 4 の液化溶液を得、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを含む濃縮酵素液を澱粉固形物 1 グラム当り 0.25 ml の割合になるように加え、更にシクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ(株式会社林原生物化学研究所製造)を澱粉固形物 1 グラム当り 10 単位になるように加え、pH 6.0、温度 35 で 48 時間反応させた。その反応液を 95℃で 30 分間保った後、pH 5.0、温度 50℃に調整した後、 $\alpha$ -グルコシダーゼ剤(商品名『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」、天野製薬株式会社製造』を固形物 1 グラム当たり 300 単位加え、24 時間反応させ、更にグルコアミラーゼ剤(商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社製)を固形物 1 グラム当たり 30 単位加え、17 時間反応させ、その反応液を 95℃に加熱し 30 分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法にしたがって、活性炭で脱色し、H 型及び OH 型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度 60% の環状四糖含有シラップを原料澱粉固形物当たり収率約 90% で得た。実施例 A-1 に記載の方法にしたがってクロマト分離し、環状四糖の純度が 98% 以上の画分を回収した。これを実験 20 の方法にしたがって、エバポレーターで固形物濃度約 50% に濃縮した後、この濃縮糖液約 5 kg を円筒状のプラスチック容器に入れ、穏やかに回転させながら約 20 時間で温度を 65℃から 20℃まで降下させることにより晶析させたところ、5 乃至 6 含水結晶環状四糖粉末が得られた。これをガラス容器に入れ、予め温度 140℃に保温したオイルバス中にそのガラス容器を 30 分間保持した。得られた乾燥物を粉碎機にて粉碎し、水分約 2.

7 % の 1 含水結晶環状四糖粉末を得た。本品は、強力な脱水能を有し、脱水剤として、含水物例えば食品、化学品、医薬品又はその原料、中間品などの含水物の脱水方法に有利に利用できる。

#### 実施例 A - 3 無水非晶質環状四糖の製造方法

- 5 実施例 A - 1 に記載の方法にしたがって得られた環状四糖の純度が 98 % 以上の画分を、常法にしたがって脱塩、脱色、濾過した後、その濃度を 50 % にした。これを -80 °C で急速に凍結した後、その凍結物を凍結真空乾燥を行い、さらに 80 °C で 3 時間真空乾燥し、得られた乾燥物を粉碎機にて粉碎し、水分約 0.3 % の無水非晶質環状  
10 四糖粉末を得た。この X 線回折図形を図 33 に示す。本品は、強力な脱水能を有し、脱水剤として、含水物例えば食品、化学品、医薬品又はその原料、中間品などの含水物の脱水方法に有利に利用できる。

#### 実施例 A - 4 パノースから無水結晶環状四糖の製造方法

- 澱粉から製造されたパノース（株式会社林原生物化学研究所製造）  
15 の水溶液（約 100 l）を濃度 4 w / v %、pH 6.0、温度 30 °C に調整した後、実験 7 の方法で得た精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品をパノース 1 グラム当たり 2 単位加え、48 時間作用させた後、100 °C で 10 分間熱処理して酵素を失活させた。この反応液の一部を採り、HPLC で環状四糖生成量を調べたところ、糖組成として約  
20 44 % であった。この反応液を pH 5.0、温度 45 °C に調整した後、 $\alpha$ -グルコシダーゼ剤（商品名『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」』、天野製薬株式会社製）を固形物 1 グラム当たり 1500 単位を添加し、更にグルコアミラーゼ剤（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社製）を固形物 1 グラム当たり 75 単位を添加して、24 時  
25 間反応させ、残存する還元性オリゴ糖などを加水分解し、更に、水酸化ナトリウムで pH 5.8 に調整し 90 °C で 1 時間保持して酵素を失

活させ、不溶物を濾過して除去した。この濾液を逆浸透膜を用いて固  
形分濃度約 16 % まで濃縮した後、常法にしたがって脱色、脱塩、濾  
過、濃縮したところ、固形分約 3,650 g を含む糖液約 6.1 kg  
を得た。得られた糖液を、実施例 A-1 に記載の方法にしたがってク  
5 ロマト分離し、環状四糖の純度が 98 % 以上の画分を回収し、常法に  
したがって脱色、脱塩、濾過、濃縮したところ、固形分約 1,000  
g を含む糖液約 3 kg を得た。得られた糖液の糖組成を HPLC 法で  
測定したところ、環状四糖の純度は約 99.2 % であった。得られた  
環状四糖水溶液をエバポレーターで濃度約 50 % に濃縮した後、得ら  
10 れた濃縮糖液約 2 kg を円筒状のプラスチック容器に入れ、緩やかに  
回転させながら約 20 時間で温度を 65 °C から 20 °C まで下げて晶  
析させ、乾燥して、5 乃至 6 含水結晶環状四糖を得た。得られた 5 乃  
至 6 含水結晶環状四糖をさらに温度 120 °C で 16 時間真空乾燥し、  
水分約 0.2 % の無水結晶環状四糖を得た。本品は、強力な脱水能を  
15 有し、脱水剤として、含水物例えば食品、化学品、医薬品又はその原  
料、中間品などの含水物の脱水方法に有利に利用できる。

#### 実施例 B-1 脱水剤

実施例 A-1 の方法で得た無水結晶環状四糖粉末を用いて、紙製の  
透湿性小袋に 15 g ずつ充填し、脱水剤を製造した。本品は、味付け  
20 海苔、クッキーなどの乾燥食品を封入した防湿容器内雰囲気脱水剤  
として有利に利用できる。また、各種乾燥食品、油性食品などに対し、  
本脱水剤とともに脱酸素剤などを併用して、これら食品などを安定保  
存することも有利に実施できる。

#### 実施例 B-2 脱水剤入り砂糖

25 砂糖 50 重量部に実施例 A-4 の方法で得た無水結晶環状四糖粉  
末 1 重量部を添加し、高速回転ミキサーで混合して得た混合物をそれ

5 ぞれ 1 k g ずつポリエチレン袋に入れ、脱気後ポリエチレン袋の口を熱シールして閉封して、脱水剤入り砂糖を製造した。本品は、本発明の脱水剤が砂糖の微細結晶表面の水分を吸収し、砂糖の固着及び固結を防止するので安定に保存される。また、本品は調味料として各種調理、加工食品の製造などに有利に利用できる。

#### 実施例 B - 3 脱水剤入り食塩

食塩 1 0 0 重量部に実施例 A - 1 の方法で得た無水結晶環状四糖粉末 1 重量部を添加し、高速回転ミキサーで混合して得た混合物をそれぞれ 1 k g ずつポリエチレン袋に入れ、脱気後ポリエチレン袋の口  
10 を熱シールして閉封して、脱水剤入り食塩を製造した。本品は、本発明の脱水剤が食塩の微細結晶表面の水分を吸収し、食塩の固着及び固結を防止するので安定に保存される。また、本品は調味料として各種調理、加工食品の製造などに有利に利用できる。

#### 実施例 B - 4 そぼろ求肥

15 餅粉 4 重量部を水 6 重量部で溶いて、木枠に濡れ布きんを敷いたものに流し込み、これを 1 0 0 °C で 2 0 分間蒸した後、実施例 A - 1 の方法で得た無水結晶環状四糖粉末 6 重量部及び砂糖 1 重量部を捏り込み、次いで水飴 2 重量部を加えて、十分に捏ねた後に成形し、更に、室内に 1 6 時間放置して、本品の表層において無水結晶環状四糖を 5  
20 乃至 6 含水結晶環状四糖に変換させ、これを軽くロール掛けして表面をひび割れさせ、そぼろ風の求肥を得た。本品は、風味良好で、微生物汚染を受けにくく、高品質を長期間に互って維持した。

#### 実施例 B - 5 いも菓子

さつまいもを厚さ約 1 c m にスライスし、これを蒸した後放冷し、  
25 これに実施例 A - 3 の方法で得た無水非晶質環状四糖粉末をまぶし 5 乃至 6 含水結晶環状四糖に変換させて脱水し、表面に 5 乃至 6 含水

結晶環状四糖の付着したいも菓子を製造した。本品は風味良好で安定ないも菓子である。

#### 実施例 B - 6 粉末クリーム

生クリーム 1 重量部に実施例 A - 1 の方法で得た無水結晶環状四糖粉末 3 重量部を混合した後バットに移し、2 日間放置して 5 乃至 6 含水結晶環状四糖に変換させブロックを調製した。本ブロックを切削機にかけて粉末化し、分級して風味良好な粉末クリームを得た。本品は、風味良好な粉末クリームで、コーヒー、紅茶の味付けに、また、プレミックス、冷菓、ケーキ、キャンディー類などの製菓材料、経管流動食などの治療用栄養剤などとして有利に利用できる。

#### 実施例 B - 7 粉末ブランディー

ブランディー 2 重量部にプルラン 10 重量部を混合し、これに実施例 A - 1 の方法で得た無水結晶環状四糖粉末 7 重量部を混合した後バットに移し、2 日間放置して 5 乃至 6 含水結晶環状四糖に変換させブロックを調製した。本ブロックを切削機にかけて粉末化し、分級して風味良好な粉末ブランディーを得た。本品を口に含めば、適度の甘味を有し、ブランディー香の十分な粉末香料である。本品は紅茶用香り付けとして、また、プレミックス、キャンディー類などの製菓材料などとして有利に利用できる。また、本粉末を顆粒成形機、打錠機にかけて成型し、顆粒、錠剤として利用することも有利に実施できる。

#### 実施例 B - 8 粉末味噌

赤味噌 2 重量部に実施例 A - 2 の方法で得た 1 含水結晶環状四糖粉末 4 重量部を混合し、多数の半球状凹部を設けた金属板に流し込み、これを室温下で一夜静置して固化し、離型して 1 個当たり約 4 g の固形味噌を得、これを粉碎機にかけて粉末味噌を得た。本品は、即席ラーメン、即席吸物などの調味料として有利に利用できる。また、固形味

噌は、固形調味料としてだけでなく味噌菓子などとしても利用できる。

#### 実施例 B - 9 粉末醤油

実施例 A - 3 の方法で得た無水非晶質環状四糖粉末 3 . 5 重量部及び実験 20 の方法で得た 5 乃至 6 含水結晶環状四糖 0 . 0 2 重量部を  
5 コンベア上で流動させつつ、これに対して薄口醤油を 1 重量部の割合になるように噴霧し、次いで熟成塔に移し、30℃で一夜放置して無水非晶質環状四糖を 5 乃至 6 含水結晶環状四糖に変換させて粉末醤油を得た。本品は、即席ラーメン、即席吸物などの調味料として有利に利用できる。

#### 10 実施例 B - 10 粉末卵黄

生卵から調製した卵黄を、プレート式加熱殺菌機で 60 乃至 64℃で殺菌し、得られる液状卵黄 1 重量部に対して、実施例 A - 1 の方法で得た無水結晶環状四糖粉末 3 . 5 重量部の割合で混合した後、実施例 B - 7 と同様にブロック化し粉末化して粉末卵黄を得た。本品は、  
15 プレミックス、冷菓、乳化剤などの製菓用材料としてのみならず、経口流動食、経管流動食などの離乳食、治療用栄養剤などとしても有利に利用できる。また美肌剤、育毛剤などとしても有効に利用できる。

#### 実施例 B - 11 粉末ヨーグルト

プレーンヨーグルト 1 重量部に実施例 A - 3 の方法で得た無水非  
20 晶質環状四糖粉末 3 . 6 重量部を混合した後、実施例 B - 7 と同様にブロック化し、粉末化して粉末ヨーグルトを得た。本品は、風味良好であるだけでなく、乳酸菌を生きたまま長期に安定化し得る。また、プレミックス、冷菓、乳化剤などの製菓用材料としてのみならず、経口流動食、経管流動食などの離乳食、治療用栄養剤などとして、更に  
25 は、例えば、マーガリン、ホイップクリーム、スプレッド、チーズケーキ、ゼリーなどに含有させヨーグルト風味の製品にするなどに有利

に利用できる。さらに本粉末を顆粒成型機、打錠機などで成型して乳酸菌製剤とし、整腸剤などとして利用することも有利に実施できる。

#### 実施例 B-12 ホットケーキミックス

小麦粉 200 重量部に実施例 B-10 の方法で得られた粉末卵黄  
5 60 重量部、バター 25 重量部、砂糖 10 重量部、ベーキングパウダー 12 重量部及び食塩 0.5 重量部を配合してホットケーキミックスを得た。本品は、水、牛乳などで溶いて焼くことにより、簡単に風味良好なホットケーキを調製することができる。

#### 実施例 B-13 粉末薬用人参エキス

10 薬用人参エキス 0.5 重量部に実施例 A-1 の方法で得た無水結晶環状四糖粉末 1.2 重量部を混捏した後、実施例 B-7 と同様にブロック化し、粉末化して粉末薬用人参エキスを得た。本品を適量のビタミン B1 及びビタミン B2 粉末とともに顆粒成型機にかけ、ビタミン含有顆粒状薬用人参エキスとした。本品は、疲労回復剤、強壮、強精  
15 剤などとして有利に利用できる。また、育毛剤などとしても利用できる。

#### 実施例 B-14 粉末プロポリスエキス

プロポリスを 95 v/v % エタノール水溶液で、常法にしたがって抽出し、次いで残渣を少量の水で洗浄し、洗液を合わせて得られた  
20 プロポリス粗抽出物含有 80 v/v % エタノール（固形物約 20 w/w % 含有）水溶液に、水を加えてエタノール濃度 50 v/v % に低減して、50℃ に 1 時間保ち、プロポリス有効成分を含有する上層と粘着性沈澱物の下層を形成させ、室温で一夜放置し、この上層を分離し採取して、色調、香味、抗菌作用に優れた液状の精製プロポリス抽出  
25 液を、粗抽出粗抽出物含有溶液に対して、固形物当り約 48 % の収率で得た。この精製プロポリス抽出液 1 重量部を、実施例 A-1 の方法



で得た無水結晶環状四糖粉末 10 重量部に噴霧混合し、さらに乾燥させて風味良好な粉末プロポリスエキスを得た。本品は、抗菌剤、抗酸化剤、抗炎症剤、免疫調節剤、マクロファージ活性化剤などとして直接利用されるだけでなく、他の適宜な材料と配合して、飲食物、抗感受性疾患剤、化粧品などに有利に利用できる。

#### 実施例 B-15 粉末アイエキス

タデ科の一年生草本であるアイ（学名「ポリゴナム・ティンクトリウム」）の地上部 30 kg を破碎した後、90 v / v % エタノール水溶液で、常法にしたがって抽出し、次いで残渣を少量の水で洗浄し、洗液を合わせて得られたアイ粗抽出物含有水溶液に、水を加えてエタノール濃度 50 v / v % に低減した。この粗抽出液 1 重量部に対し、実施例 A-2 の方法で得た 1 含水結晶環状四糖 12 重量部の割合で混合した後バットに移し、2 日間放置して 5 乃至 6 含水結晶環状四糖に変換させブロックを調製した。本ブロックを切削機にかけて粉末化し、分級して粉末アイ抽出液を得た。本品は抗菌作用、抗ウイルス作用、抗腫瘍作用、ラジカル捕捉作用、アポトーシス調整作用、サイトカイン調整作用などの多彩な生理作用を具備しており、食品、化粧品及び医薬品に配合する生薬として有利に利用できる。

#### 実施例 B-16 粉末中国パセリエキス

セリ科の植物である中国パセリ（英名：コリアンダー、分類：コエンドロ属）の地上部を水洗し、水切りした後、ブレンダーを用いて細断した。細断した中国パセリを遠心濾過分離器を用いて 150 メッシュパスした抽出液を回収し、121℃で10分間処理して、固形物含量 60 mg / ml の中国パセリ抽出液を得た。この抽出液 1 重量部に対し、実施例 A-4 で得た無水結晶環状四糖 9 重量部の割合で混合した後バットに移し、2 日間放置して 5 乃至 6 含水結晶環状四糖に変換

させブロックを調製した。本ブロックを切削機にかけて粉末化し、分級して粉末中国パセリ抽出液を得た。本品は鉛などの金属の沈着を抑制する作用を具備しており、直接若しくは食品又は医薬品に配合して有利に利用できる。

#### 5 実施例 B - 1 7 粉末ローヤルゼリー

未加工のブラジル産ローヤルゼリー（水分 6 5 重量 %）1 重量部に実施例 A - 1 の方法で得た無水結晶環状四糖 7 重量部の割合で混合した後バットに移し、2 日間放置して 5 乃至 6 含水結晶環状四糖に変換させブロックを調製した。本ブロックを切削機にかけて粉末化し、  
10 粉末ローヤルゼリーを得た。さらにこれを 1 0 0 メッシュパスにより分級した後、打錠機を用いて 1 錠当り 3 0 0 m g の錠剤を製造した。本品は強壮作用、細胞賦活作用を具備しており、さらに、劣化しやすいローヤルゼリーを常温下で長期間保存できる。また、風味が改善されており、まろやかな甘味と適度な酸味を示すので、日常的に利用す  
15 る健康食品として有利に利用できる。

#### 実施例 B - 1 8 流動食用固形製剤

実施例 A - 1 の方法で得た無水結晶環状四糖粉末 4 0 0 重量部、実施例 B - 7 の方法で得られた粉末卵黄 2 7 0 重量部、脱脂粉乳 2 0 9 重量部、塩化ナトリウム 4 . 4 重量部、塩化カリウム 1 . 8 5 重量部、  
20 チアミン 0 . 0 1 重量部、L - アスコルビン酸ナトリウム 0 . 1 重量部、ビタミン E アセテート 0 . 6 重量部及びニコチン酸アミド 0 . 0 4 重量部からなる配合物を調製し、この配合物 2 5 g ずつを防湿性ラミネート小袋に充填し、ヒートシールして流動食用固形製剤を製造した。

25 本固形製剤は、小袋内雰囲気の水分会を低減し、低温貯蔵の必要もなく室温下で長期間安定である。また、水に対する分散、溶解は良好で

ある。本固形製剤は、一袋分を約 150 乃至 300 ml の水に溶解して流動食とし、経口的、又は鼻腔、胃、腸などへの経管的投与により利用される。

#### 実施例 B-19 医薬用錠剤状製剤

- 5 新生児のハムスターに、ウサギから公知の方法で調製した抗血清を注射して、ハムスターの免疫反応を弱めた後、その皮下に BALL-1 細胞を移植し、その後通常の方法で 3 週間飼育した。皮下に生じた腫瘍を摘出して細断し、生理食塩水中で分散させてほぐした。得られた細胞を血清無添加の PRMI 1640 培地 (pH 7.2) で洗浄し、  
10 同培地に約  $2 \times 10^6$  個/ml になるように懸濁し、35℃に保った。

- これに部分精製したヒトインターフェロナー $\alpha$ を 200 IU/ml の割合で加えて約 2 時間保った後、更に、センダイウイルスを約 300 赤血球凝集価/ml の割合で添加し、20 時間保ってヒトインターフェロナー $\alpha$ を誘導させた。これを、約 4℃、約 1,000 g で遠  
15 心分離して沈殿物を除去し、得られた上清を更に精密濾過し、その濾液を、公知の方法にしたがって、抗インターフェロナー $\alpha$ 抗体を固定化しているカラムにかけ、非吸着画分を除去した後、その吸着画分を溶出し、膜濃縮して濃度約 0.001 w/v %、比活性約  $2 \times 10^8$  IU/mg 蛋白質の濃縮液をハムスター一匹当たり約 4 ml の収量  
20 で得た。

- 実施例 A-1 の方法で得た無水結晶環状四糖 1 kg を粉末化し、150 メッシュパスさせ、先に得られたインターフェロナー $\alpha$ 濃縮液 0.25 ml (約  $1 \times 10^6$  IU) を蒸留水 100 ml に希釈した後、噴霧しながら均一に混ぜ合わせ、常法にしたがい打錠機を用いて 1 錠が 3  
25 00 mg (150 IU/錠) の錠剤を製造した。本製造方法は、インターフェロナー $\alpha$ 含有液を無水結晶環状四糖粉末に噴霧するだけで

脱水され、さらに均一に混合され、インターフェロナー $\alpha$ の安定化にも効果的である。

本品は、水に対して易溶であることから、抗ウイルス剤、抗腫瘍剤、抗リウマチ剤、抗免疫疾患剤などの抗感受性疾患剤として内服用剤、  
5 口腔用剤として利用することができる。また、検査用の試験薬に用いることも有利に実施できる。

#### 実施例 B-20 医薬用顆粒状製剤

ヒト由来のリンパ芽球細胞 B A L L - 1 細胞を牛胎児血清を 20% 補足した E a g l e の最少基本培地 (p H 7 . 4) に接種し、  
10 7℃で常法に従い生体外 (i n v i t r o) で浮遊培養した。得られた細胞を血清無添加の E a g l e 最少基本培地で (p H 7 . 4) で洗浄し、同培地に約  $1 \times 10^7$  個 / m l になるように懸濁した。この懸濁液にセンダイウイルスを m l 当り約 1, 000 赤血球凝集価添加し、38℃で1日保ってツモア・ネクロシス・ファクター $\alpha$ を誘導  
15 生成させた。これを 4℃、約 1, 000 g で遠心分離し、得られた上清を p H 7 . 2、0 . 01 M リン酸塩緩衝液を含有する生理食塩水で 15 時間透析し、更に精密濾過して得た濾液を常法にしたがって、抗インターフェロン抗体のカラムに流し、その非吸着画分を、抗ツモア・ネクロシス・ファクター $\alpha$  モノクローナル抗体のゲルカラム  
20 を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製し、濃縮して、濃度約 0 . 01 w / v % 比活性約  $2 \times 10^6$  J R U / m g 蛋白質の濃縮液を得た。活性収量は、誘導生成時の懸濁液 1 l 当り約  $5 \times 10^4$  J R U であった。

実施例 A-1 の方法で得た無水結晶環状四糖 1 k g を粉末化し、  
25 50 メッシュパスさせ、先に得られたツモア・ネクロシス・ファクター $\alpha$  濃縮液 0 . 5 m l (約  $1 \times 10^5$  J R U) 蒸留水 100 m l に

希釈した後、噴霧しながら均一に混ぜ合わせ、常法にしたがい顆粒形成機によって顆粒状のツモア・ネクロシス・ファクター- $\alpha$ 製剤（約 100 JRU/g）を製造した。本製造方法は、ツモア・ネクロシス・ファクター- $\alpha$ 含有液を無水結晶環状四糖粉末に噴霧するだけで脱  
5 水され、さらに均一に混合され、ツモア・ネクロシス・ファクター- $\alpha$ の安定化にも効果的である。

本品は、水に対して易溶であることから、抗ウイルス剤、抗腫瘍剤、抗リユーマチ剤、抗免疫疾患剤などの抗感受性疾患剤として内服用剤、  
10 口腔用剤として利用することができる。また、検査用の試験薬に用いることも有利に実施できる。

#### 実施例 B-21 外傷治療用膏薬

実施例 A-1 の方法で得た無水結晶環状四糖 400 重量部にヨウ素 3 重量部を溶解しメタノール 50 重量部加えて混合し、更に 10% プルラン水溶液 200 重量部及びマルトース含水結晶 50 重量部を  
15 加えて混合し、室温下で一夜放置して 5 乃至 6 含水結晶環状四糖に変換させ、適度の延び、付着性を示す外傷治療用膏薬を得た。

本品は、創面に塗るか、又は、ガーゼ、油紙などに塗るなどして使用することにより、切傷、擦り傷、火傷、水虫による潰瘍などの外傷を治療することができる。

#### 20 産業上の利用可能性

上記したことから明らかなように、本発明は、非還元性の環状四糖を有効成分とする脱水剤に関するものであって、脱水能を有する環状四糖を、例えば乾燥食品などを封入した防湿容器内の雰囲気に含まれる水分を低減させる場合、更には、例えば、食品、医薬品、化粧品、  
25 工業化学品、これらの原材料、又は加工中間物などの各種含水物の水分を低減させる場合などに有利に利用できる。脱水能を有する環状四

糖を5乃至6含水結晶環状四糖に変換させて脱水し、実質的に水分を低減させる本発明の方法は、加熱乾燥などの苛酷な条件を必要としないで、各種含水物、例えば、風味、香気を劣化しやすい食品、有効成分の分解、活性低下の伴いやすい医薬品などの品質を低下させることなく、高品質の脱水物品を容易に製造することができる。また、得られた脱水物品は、微生物汚染が防止され、加水分解、酸敗、褐変などの変質、劣化が防止され、その商品の寿命を長期にわたって安定に維持することができる。

本発明は斯くも顕著な作用効果を有する発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明である。

## 請 求 の 範 囲

1. サイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow$ ) の構造を有する糖質を有効成分とする脱水剤。

2. サイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow$ ) の構造を有する糖質が、無水結晶、1 含水結晶及び無水非晶質から選ばれる脱水能を有する糖質であることを特徴とする請求項 1 記載の脱水剤。

3. サイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow$ ) の構造を有する無水結晶が、水分 15 w/w % 未満のサイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow$ ) の構造を有する糖質のシラップを種晶共存下で 50 °C 乃至 180 °C の温度範囲に維持しつつ当該無水結晶を晶出させ、これを採取したものであることを特徴とする請求項 2 記載の脱水剤。

4. 1 含水結晶が、サイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow$ ) の構造を有する糖質のシラップ又は 5 乃至 6 含水結晶を乾燥して採取したものであることを特徴とする請求項 2 記載の脱水剤。

5. サイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -

$\alpha$ -D-グルコピラノシルー(1→6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー(1→3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー(1→}の構造を有する糖質が、澱粉質由来の糖質であることを特徴とする請求項1乃至4のいずれかに記載の脱水剤。

- 5 6. 含水物に、請求項1乃至5のいずれかに記載の脱水剤を含有、接触又は共存させることを特徴とする含水物の脱水方法。

7. 含水物を脱水することにより、サイクロ{→6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー(1→3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー(1→6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー(1→3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー(1→}の構造を有する糖質の5乃至6含水結晶を生成することを特徴とする請求項6記載の脱水方法。
- 10

8. 含水物1重量部に対して、請求項1乃至5のいずれかに記載の脱水剤を0.001乃至200重量部の範囲で含有、接触又は共存させることを特徴とする請求項6又は7記載の含水物の脱水方法。

- 15 9. 含水物が、糊化澱粉、アルコール、油溶性物質又は生理活性物質を含有していることを特徴とする請求項6、7又は8記載の含水物の脱水方法。

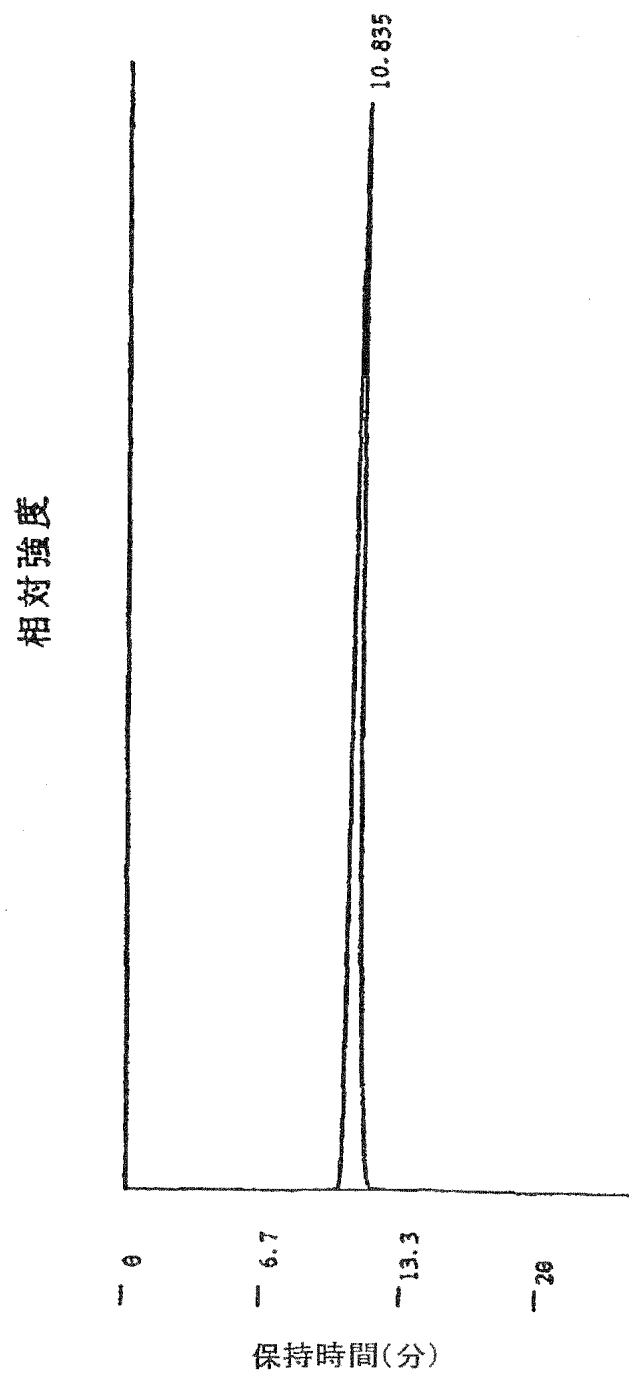
10. 含水物に、請求項1乃至5のいずれかに記載の脱水剤を含有、接触又は共存させて得られる脱水物品。

- 20 11. 脱水物品が、食品、医薬品、化粧品、これら原材料又は加工中間物であることを特徴とする請求項10記載の脱水物品。



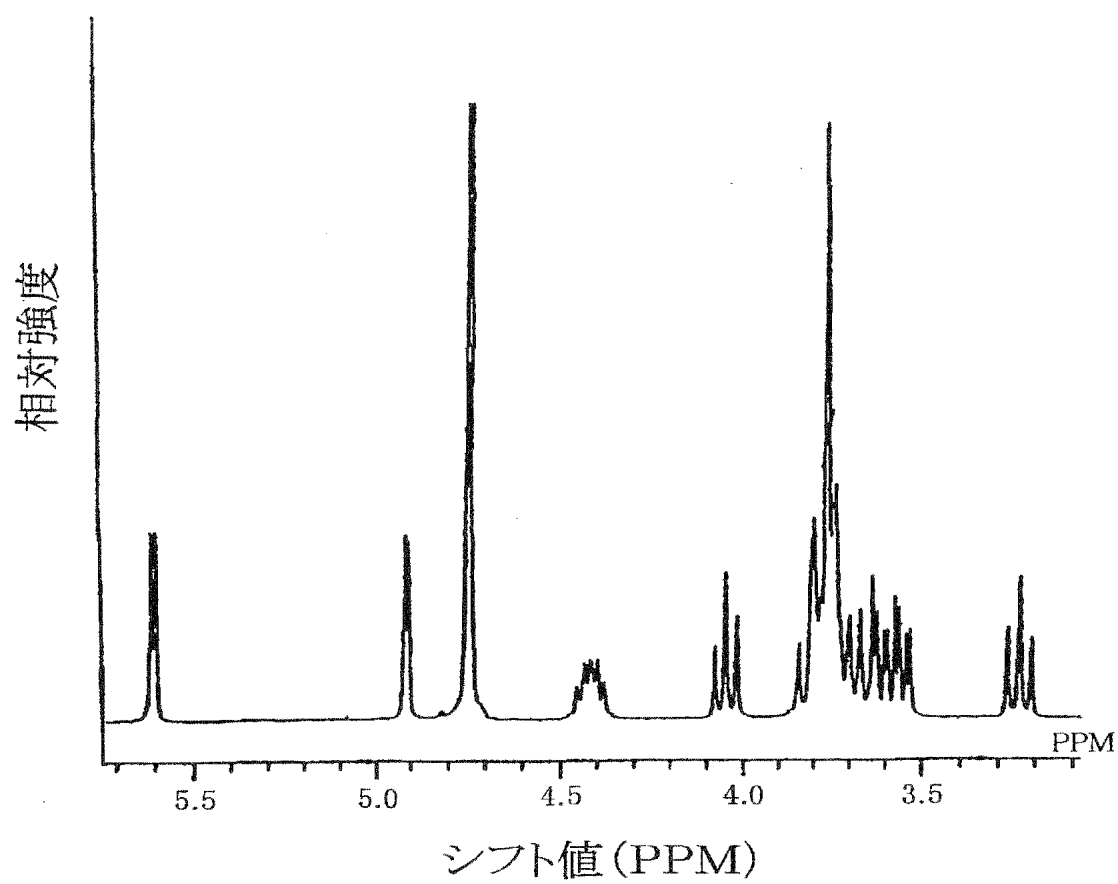
1/33

第 1 図



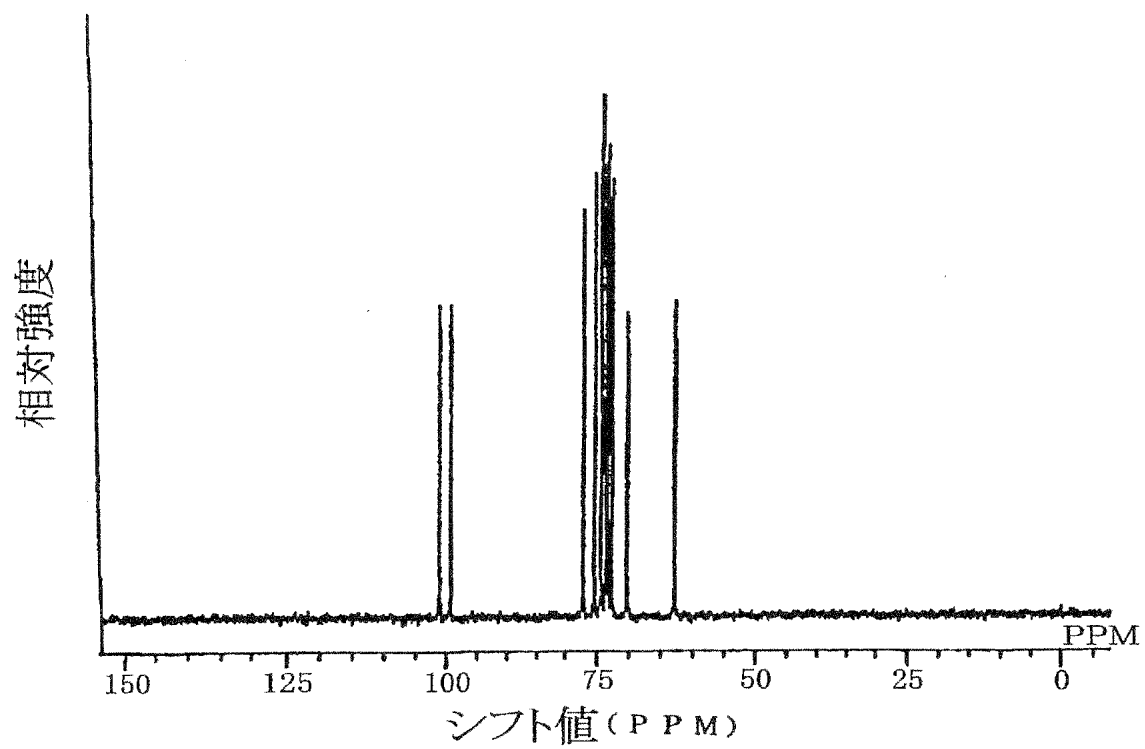
2/33

第 2 図



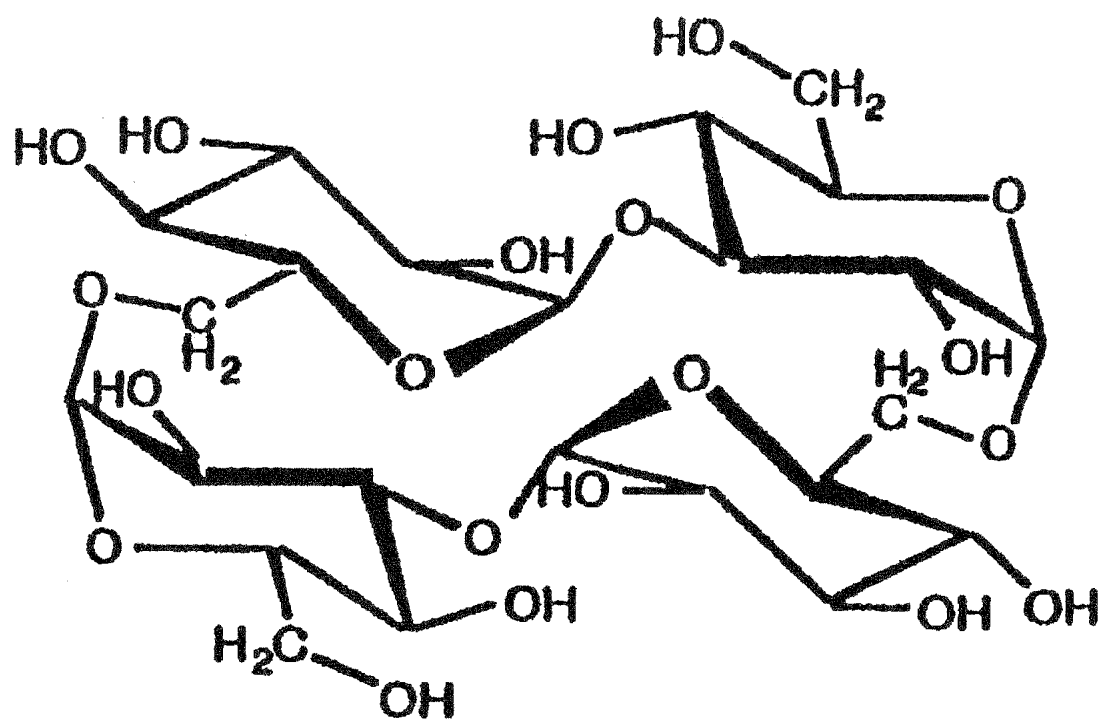
3/33

## 第 3 図



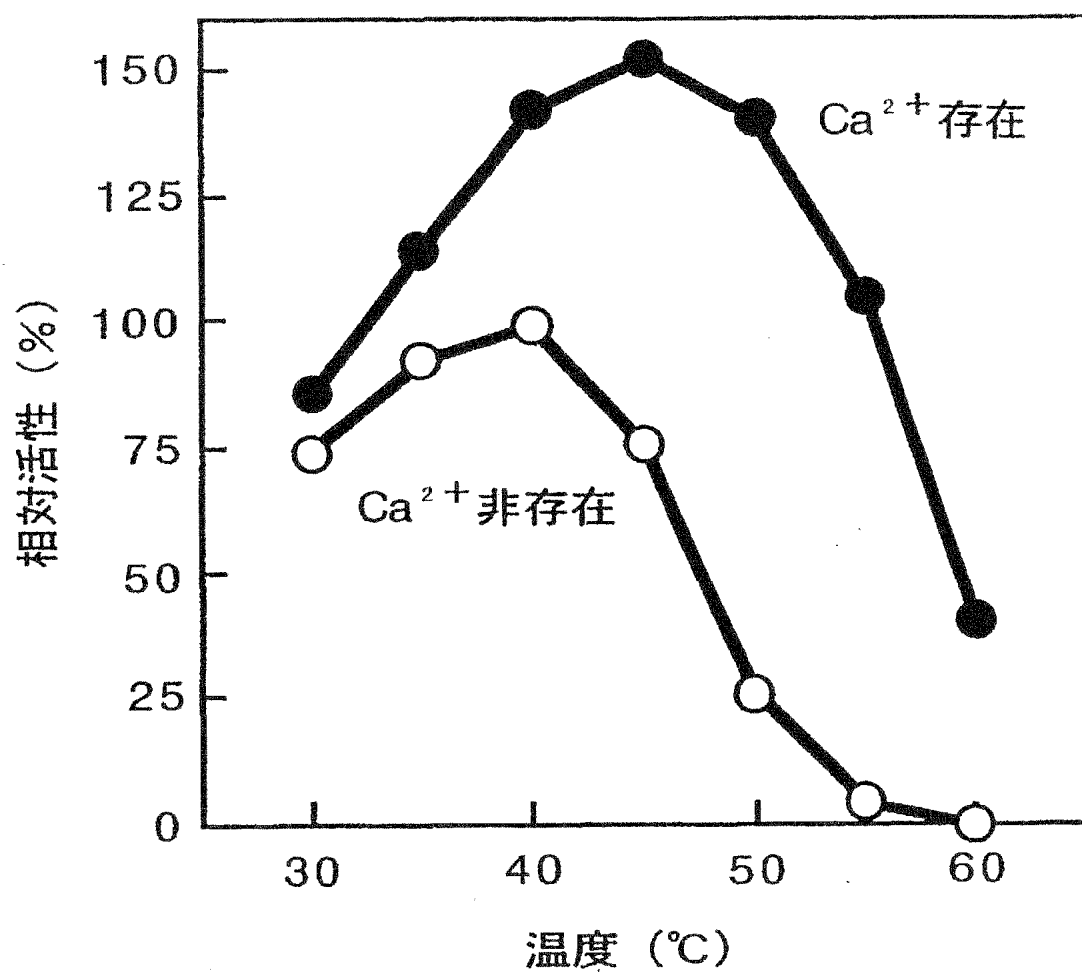
4/33

第 4 図



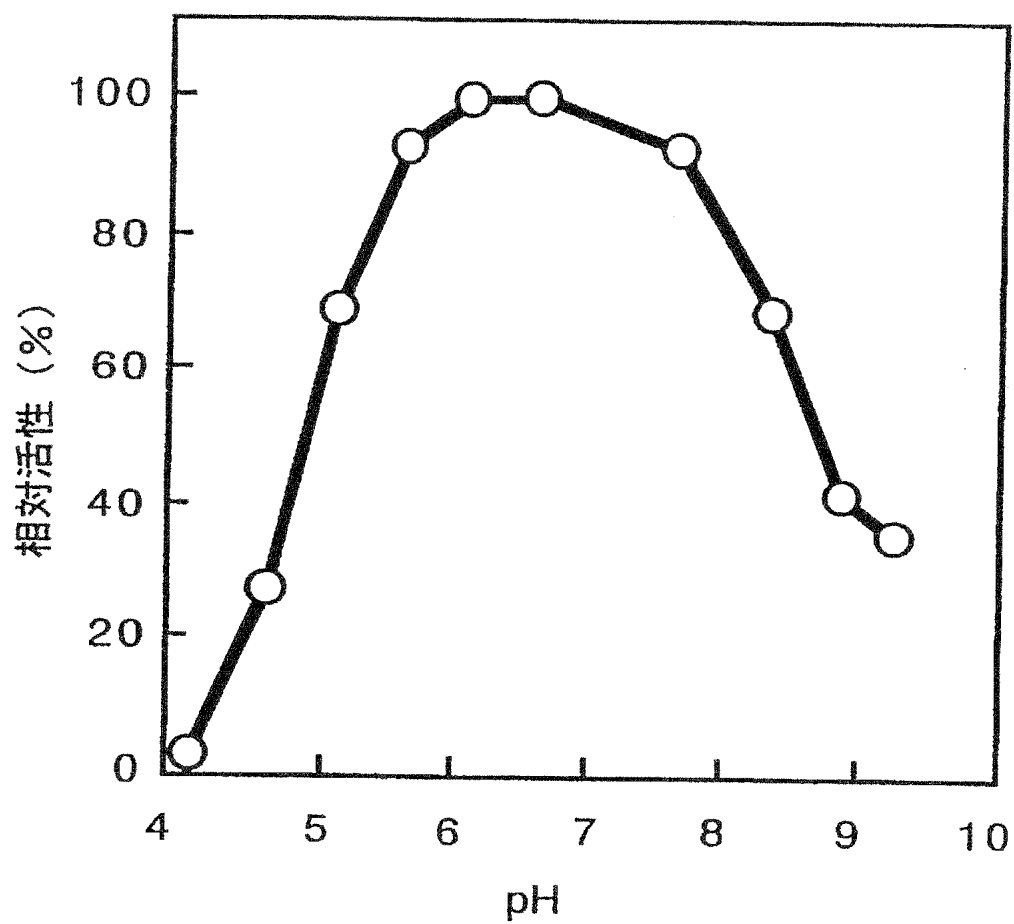
5/33

第 5 図



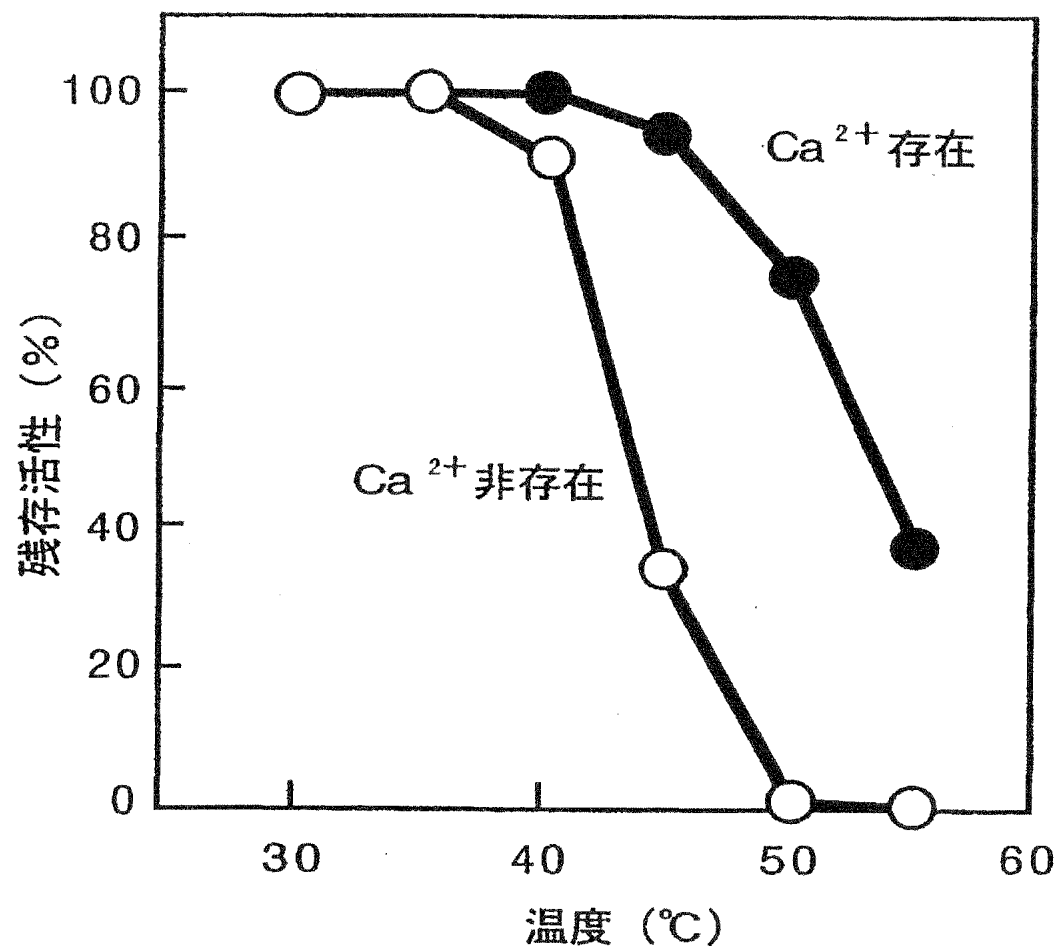
6/33

第 6 図



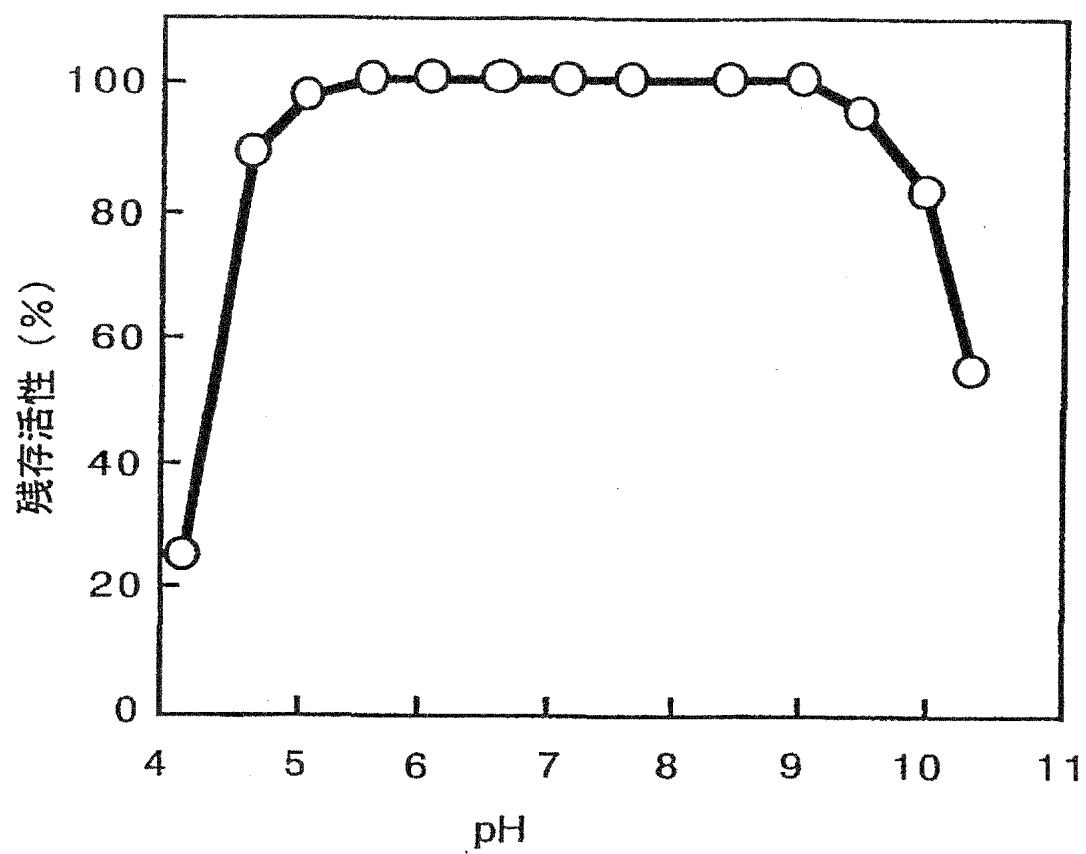
7/33

第 7 図



8/33

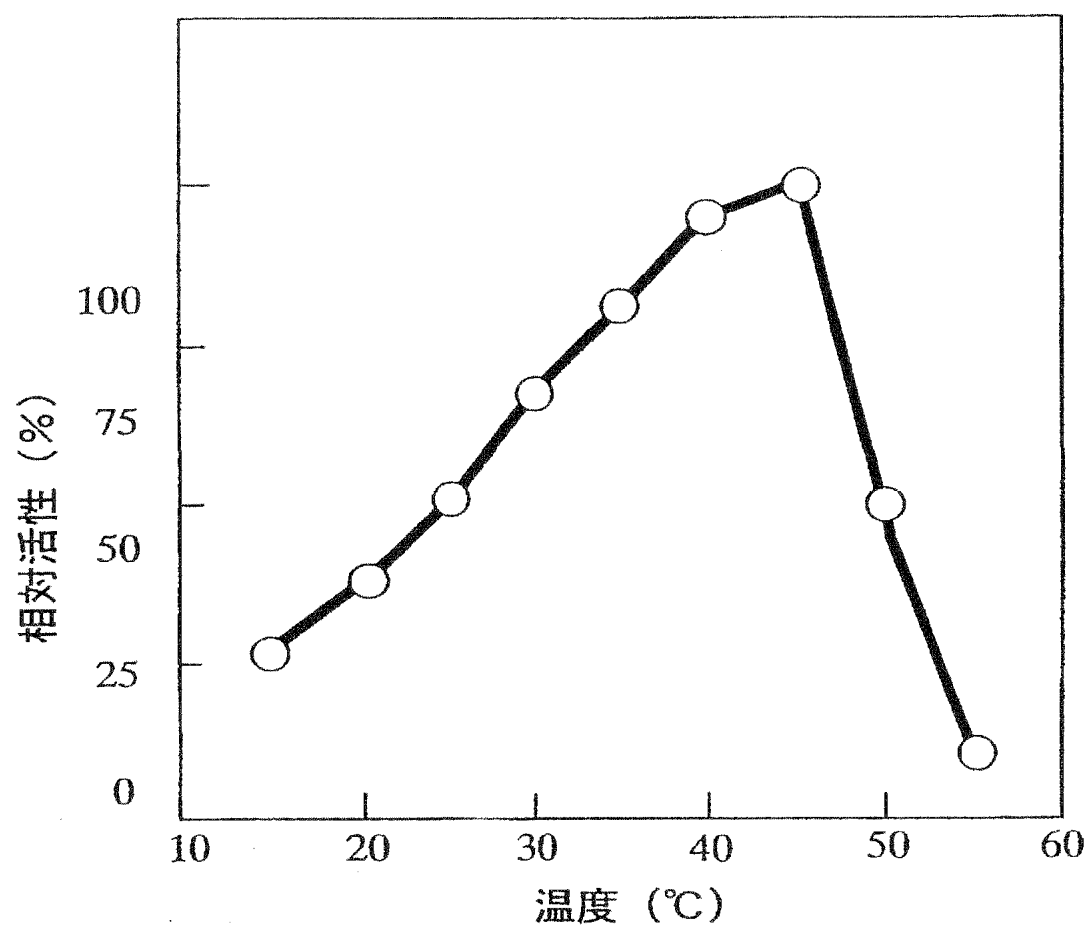
第 8 図





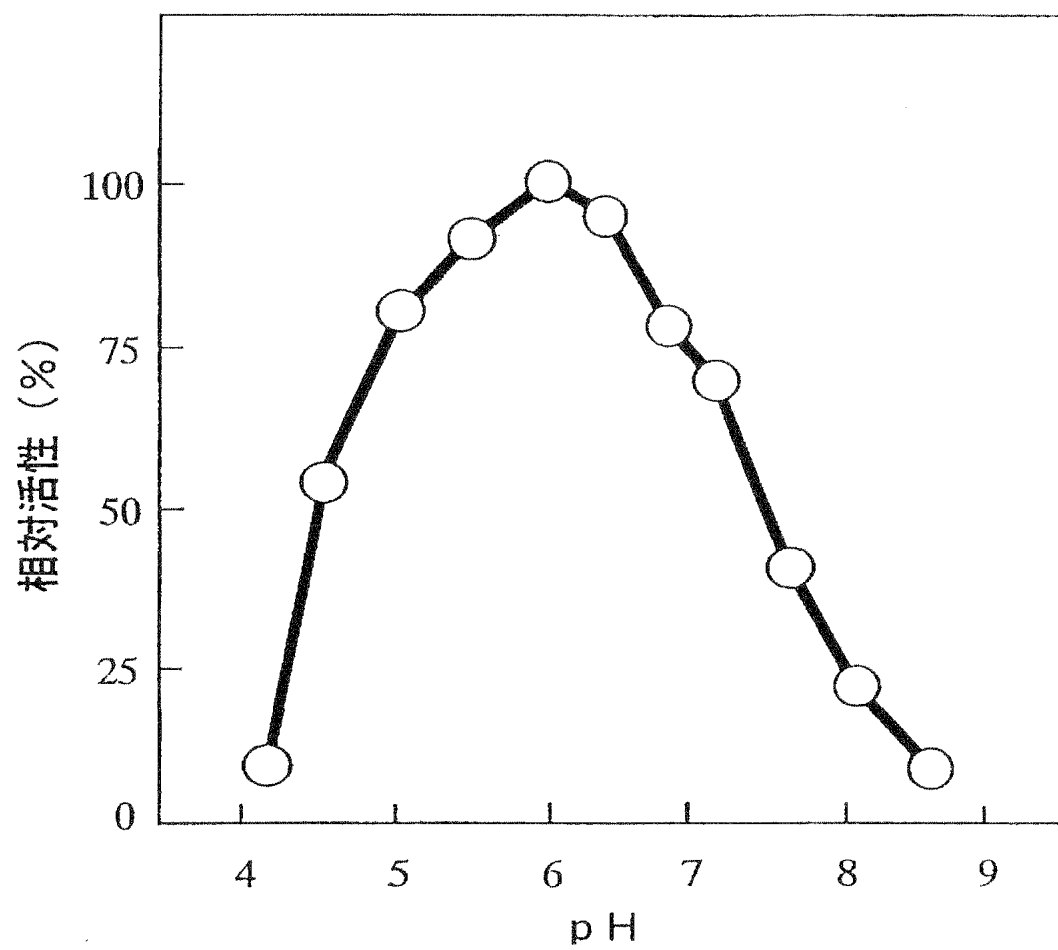
9/33

第 9 図



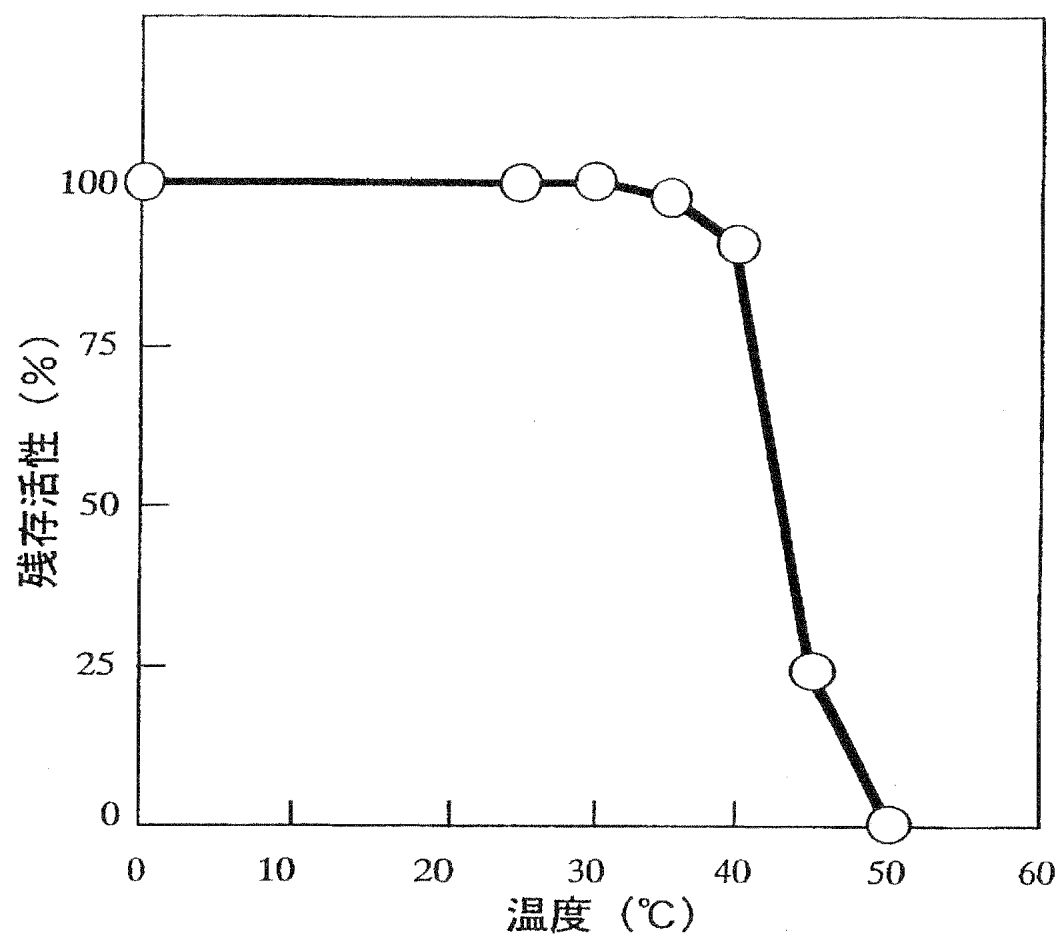
10/33

第 10 図



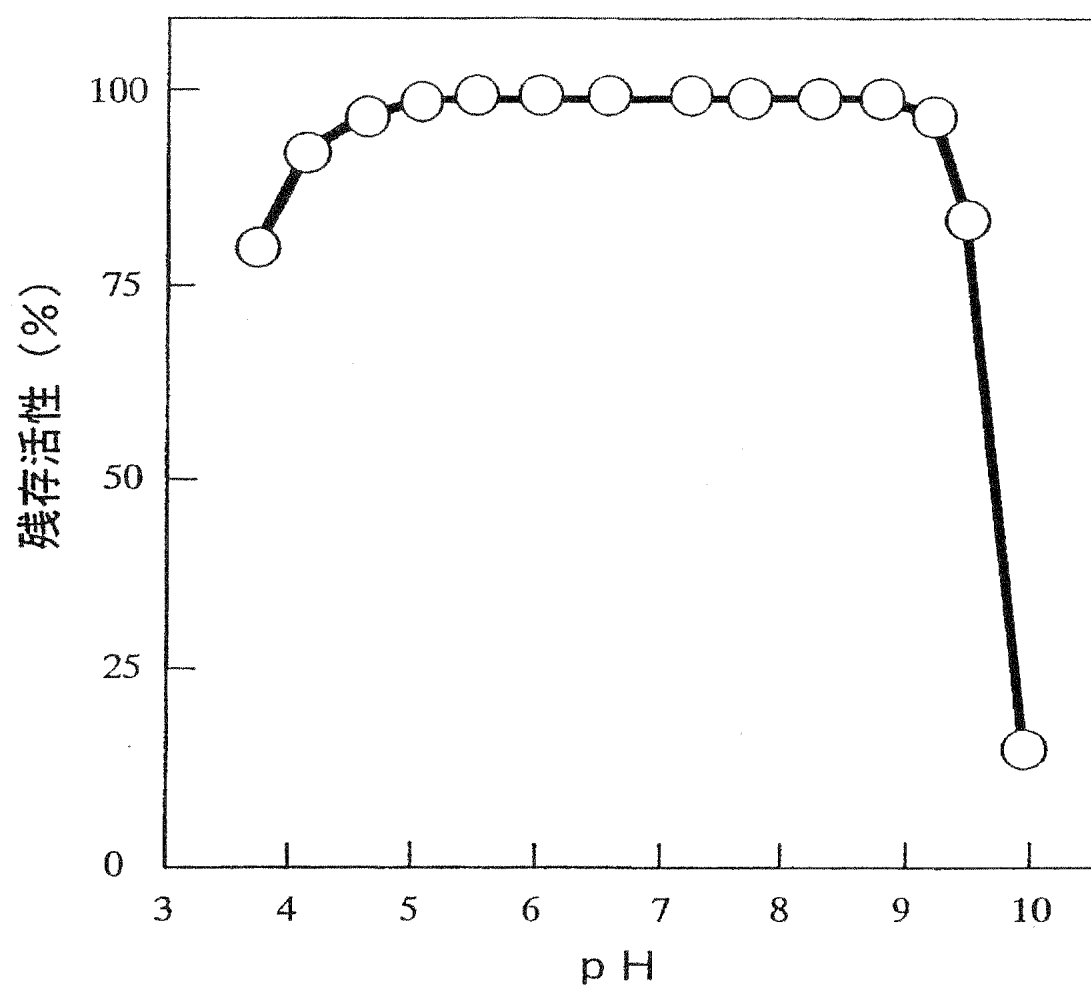
11/33

第 11 図



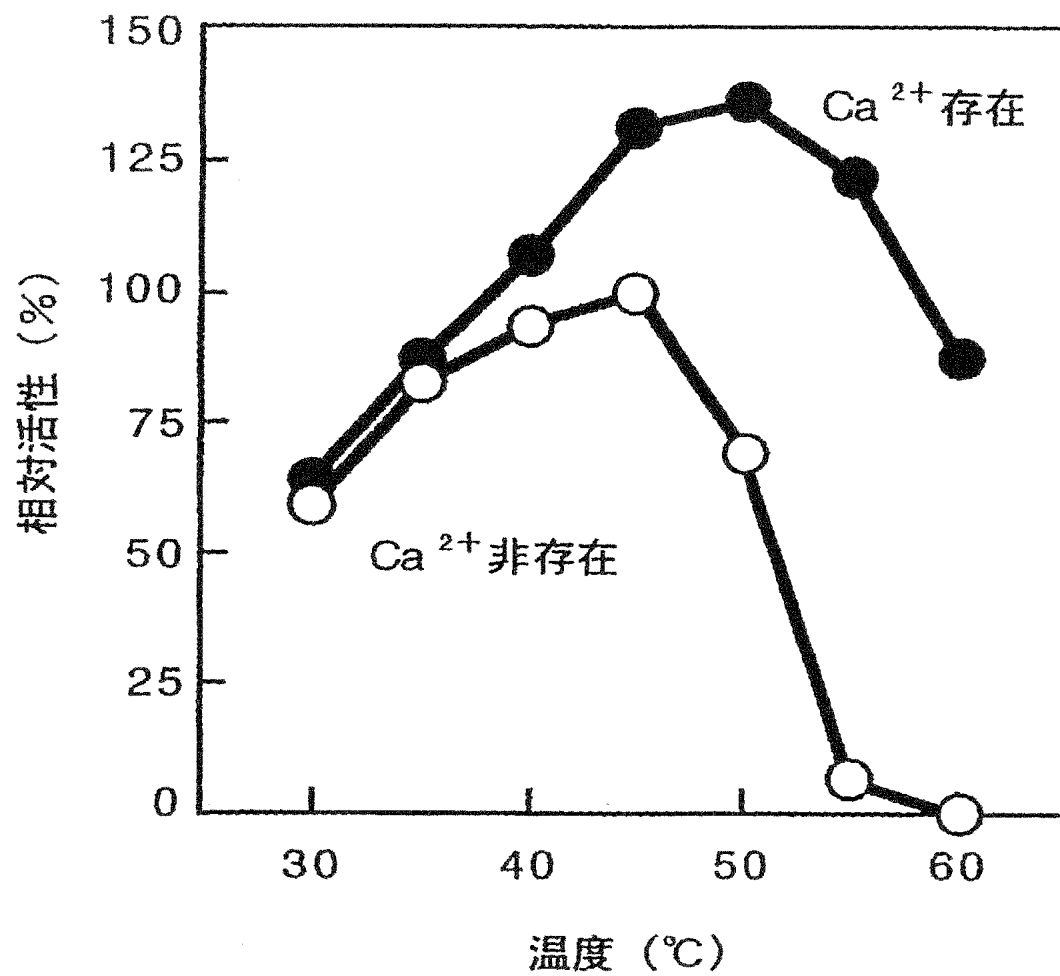
12/33

第 12 図



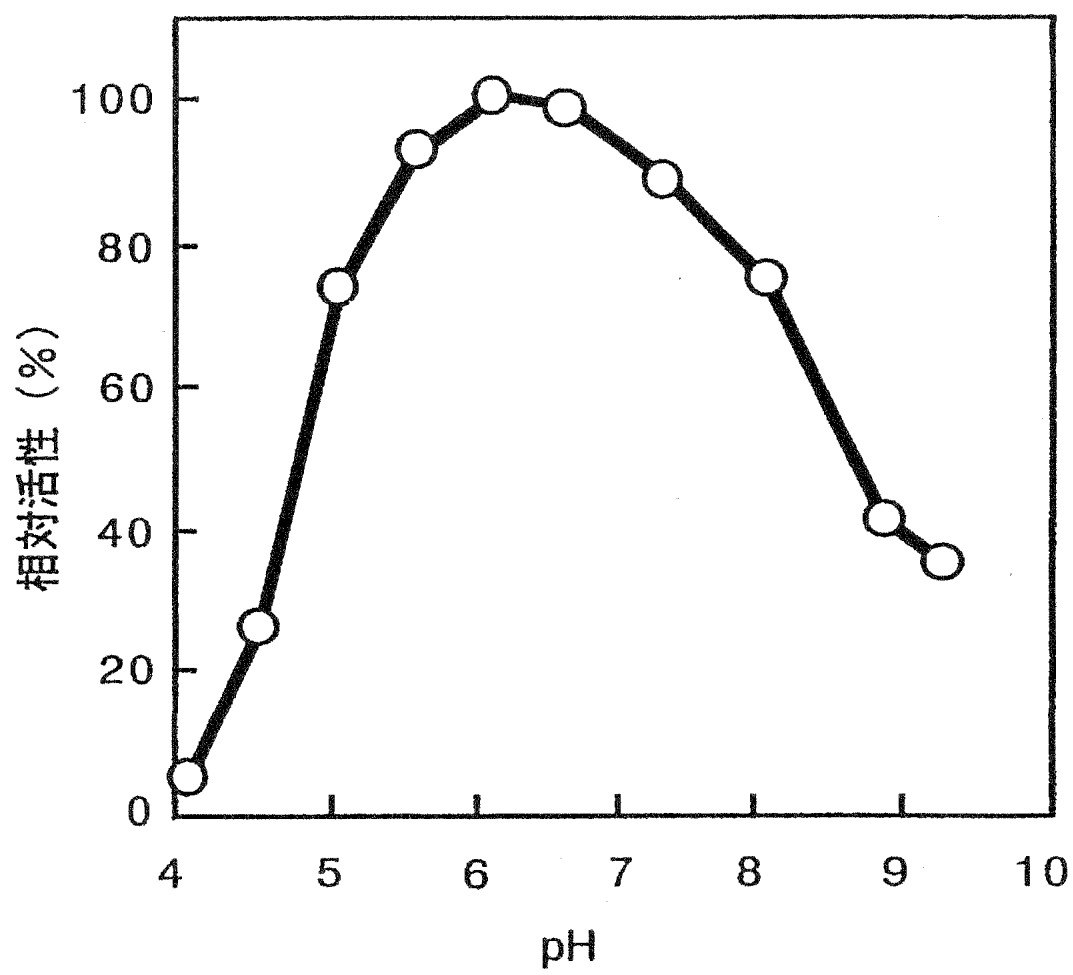
13/33

第 13 図



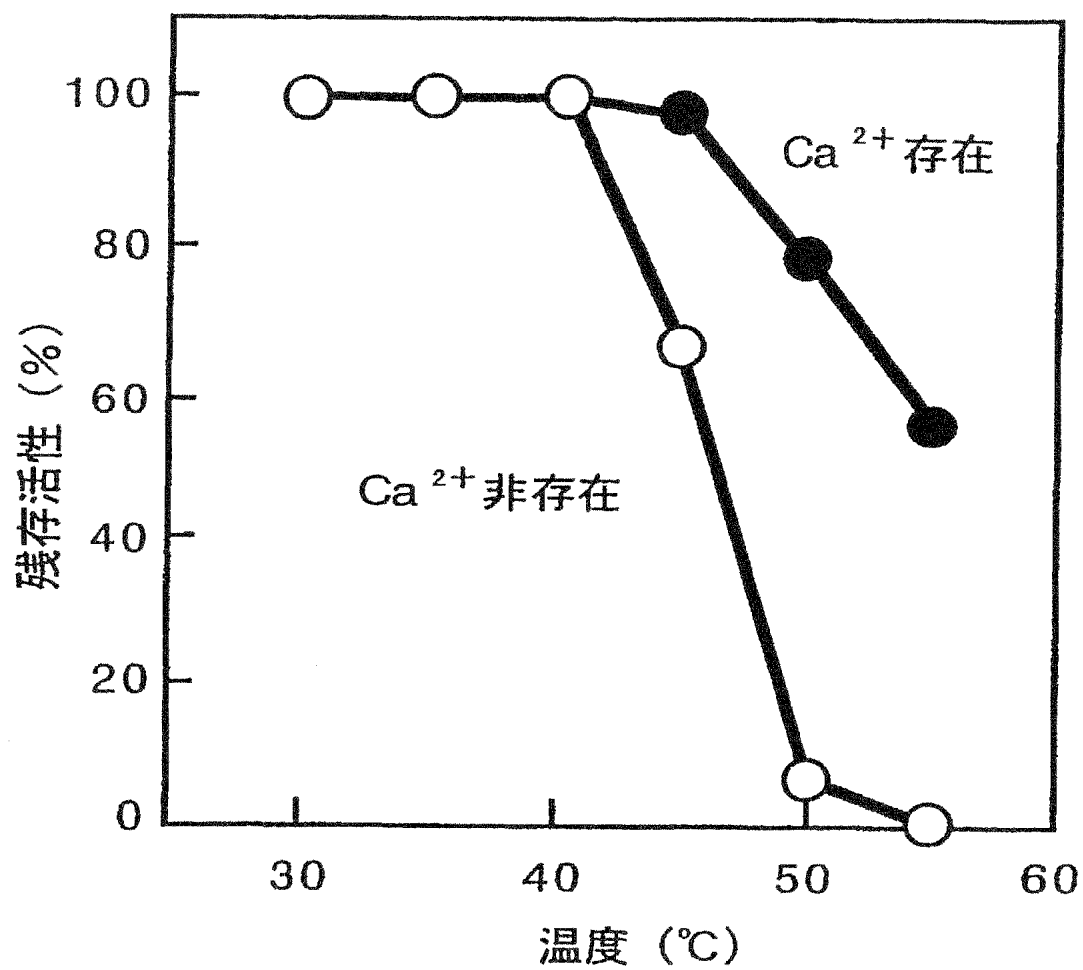
14/33

第 14 図



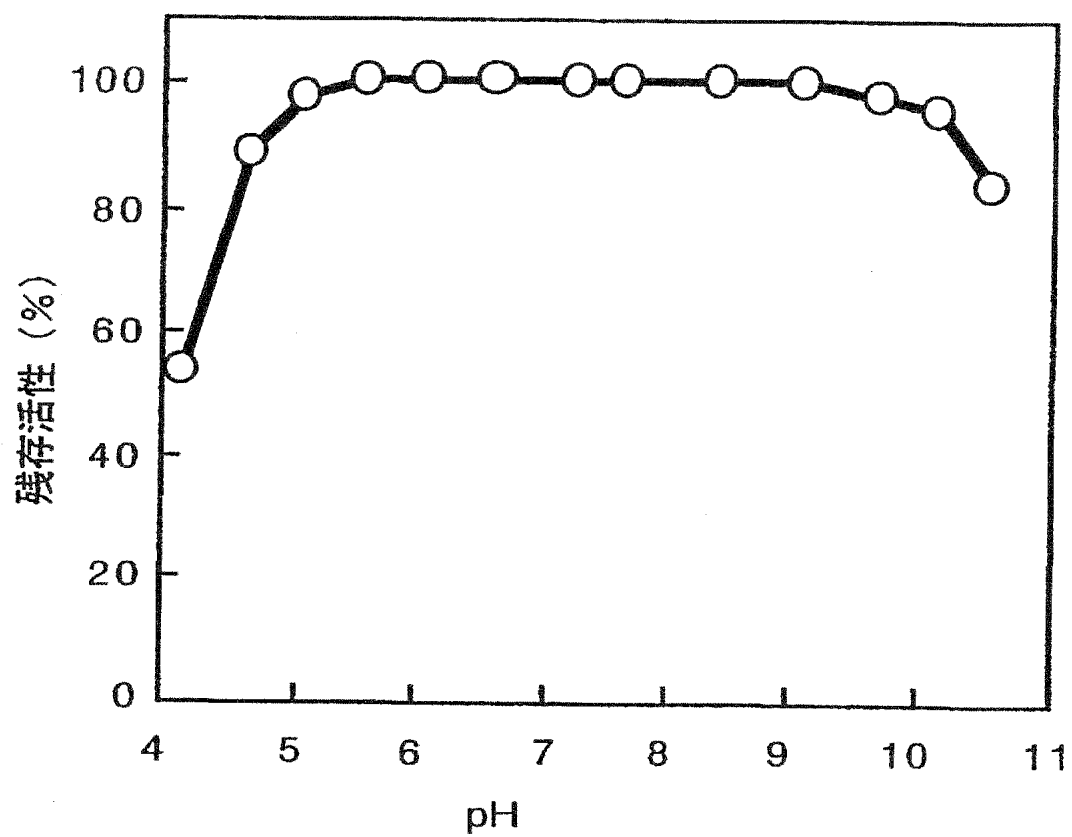
15/33

第 15 図



16/33

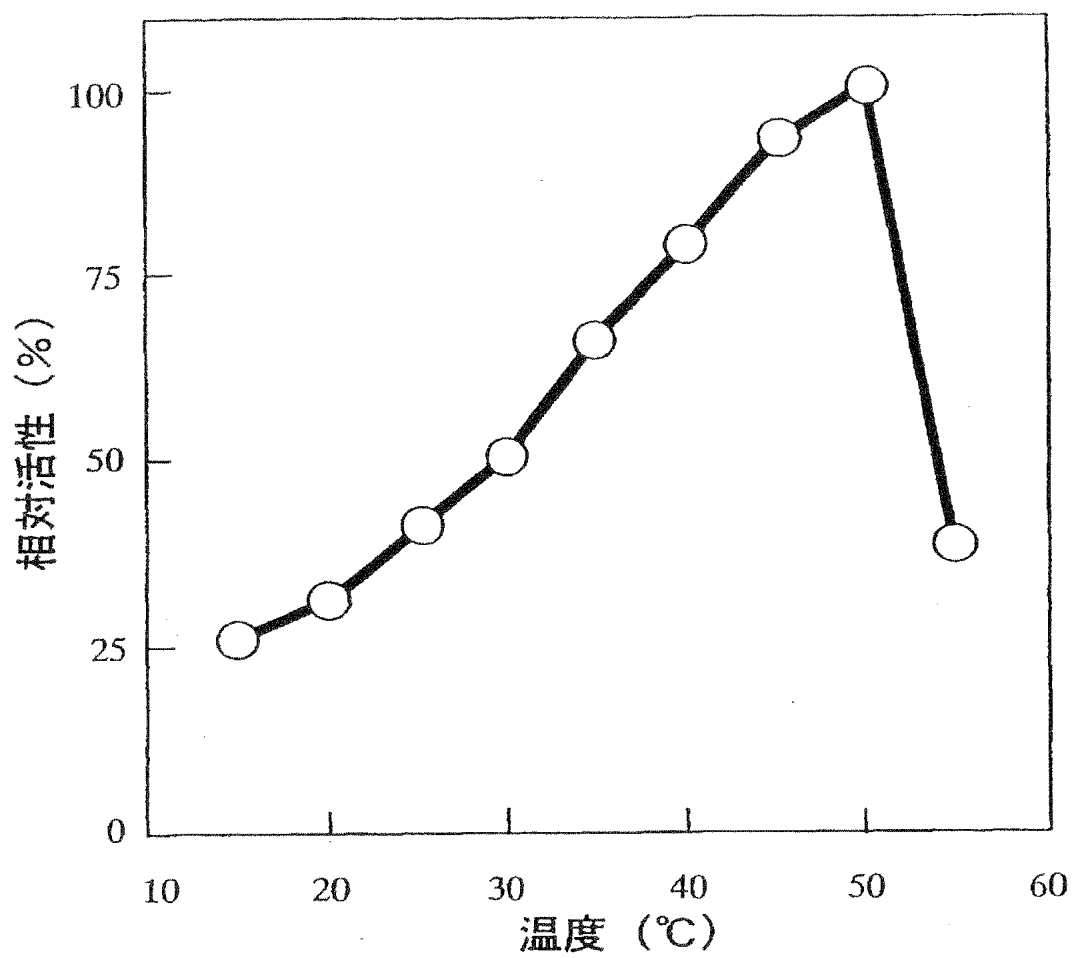
第 16 図





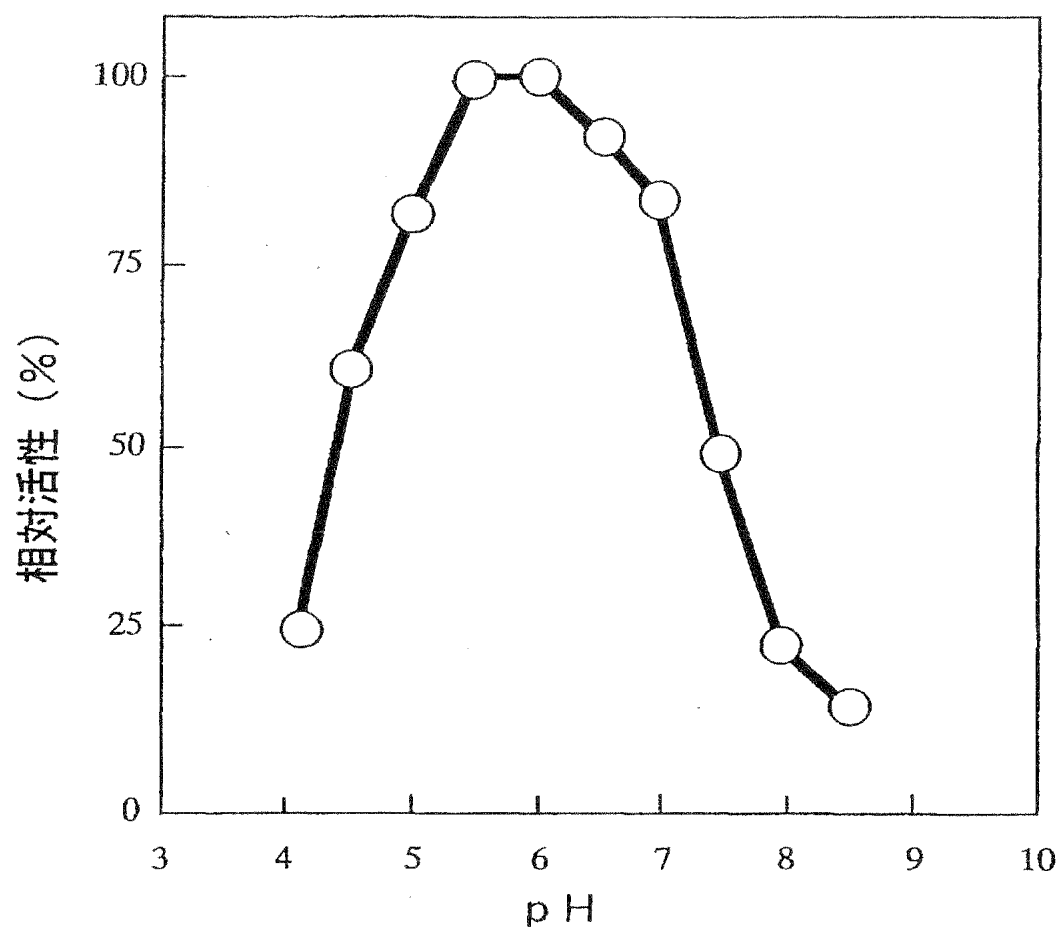
17/38

第 17 图



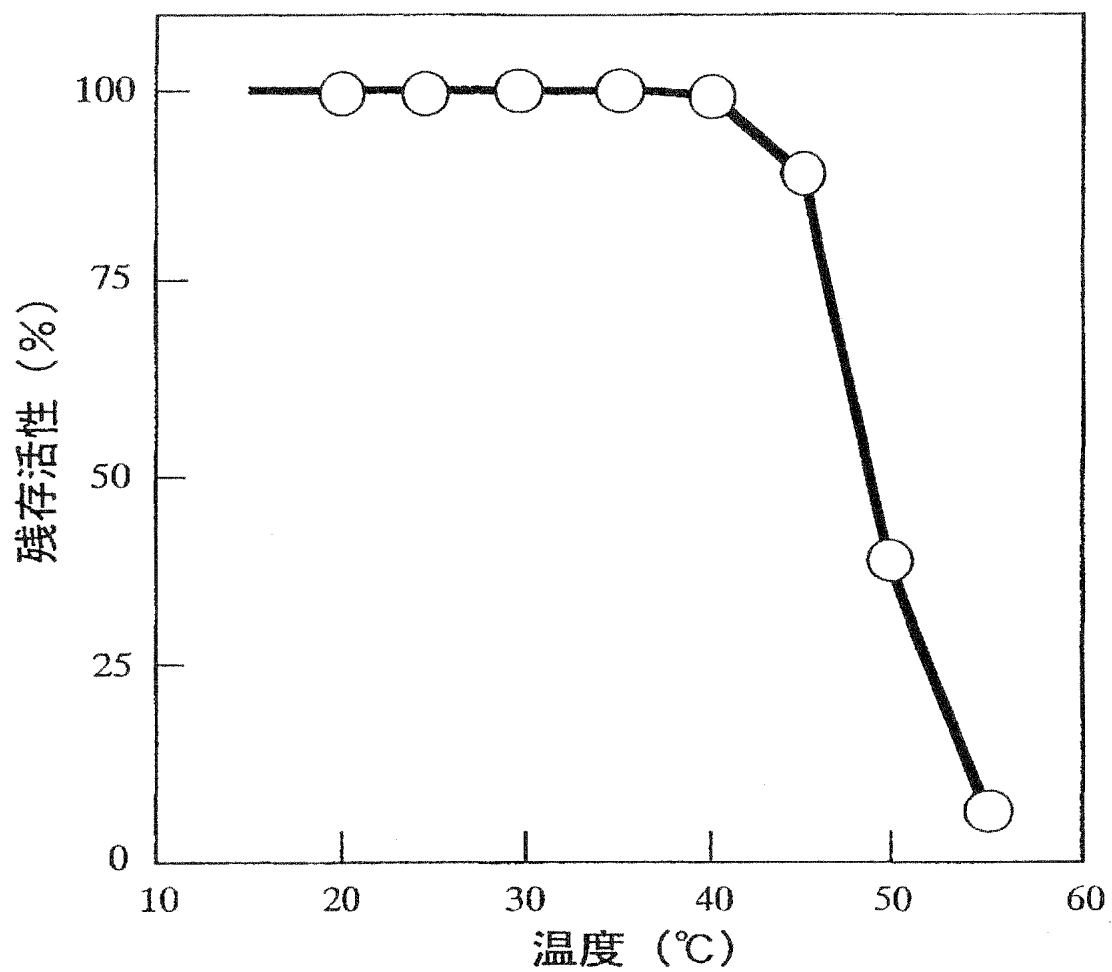
18/33

第 18 図



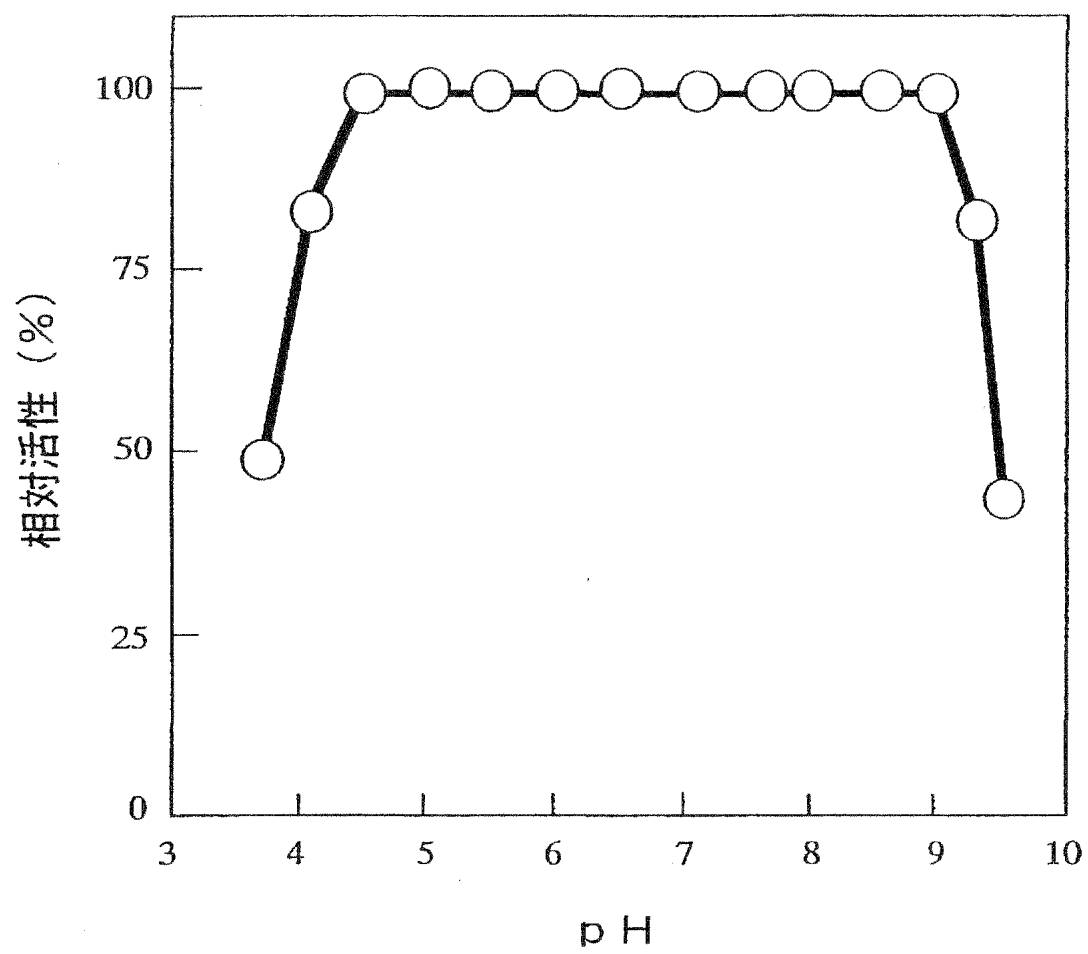
19/33

第 19 図



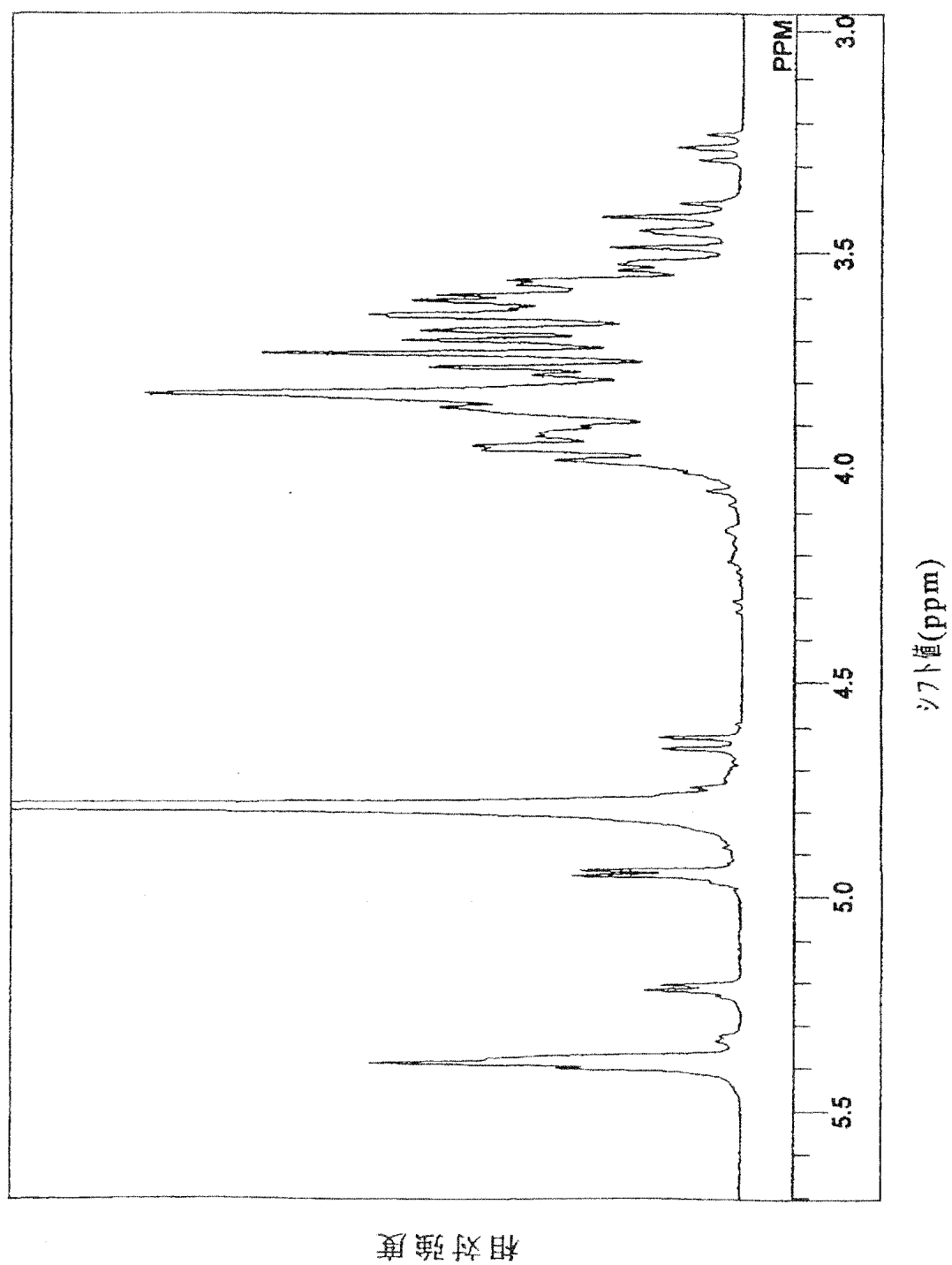
20/33

第 20 图



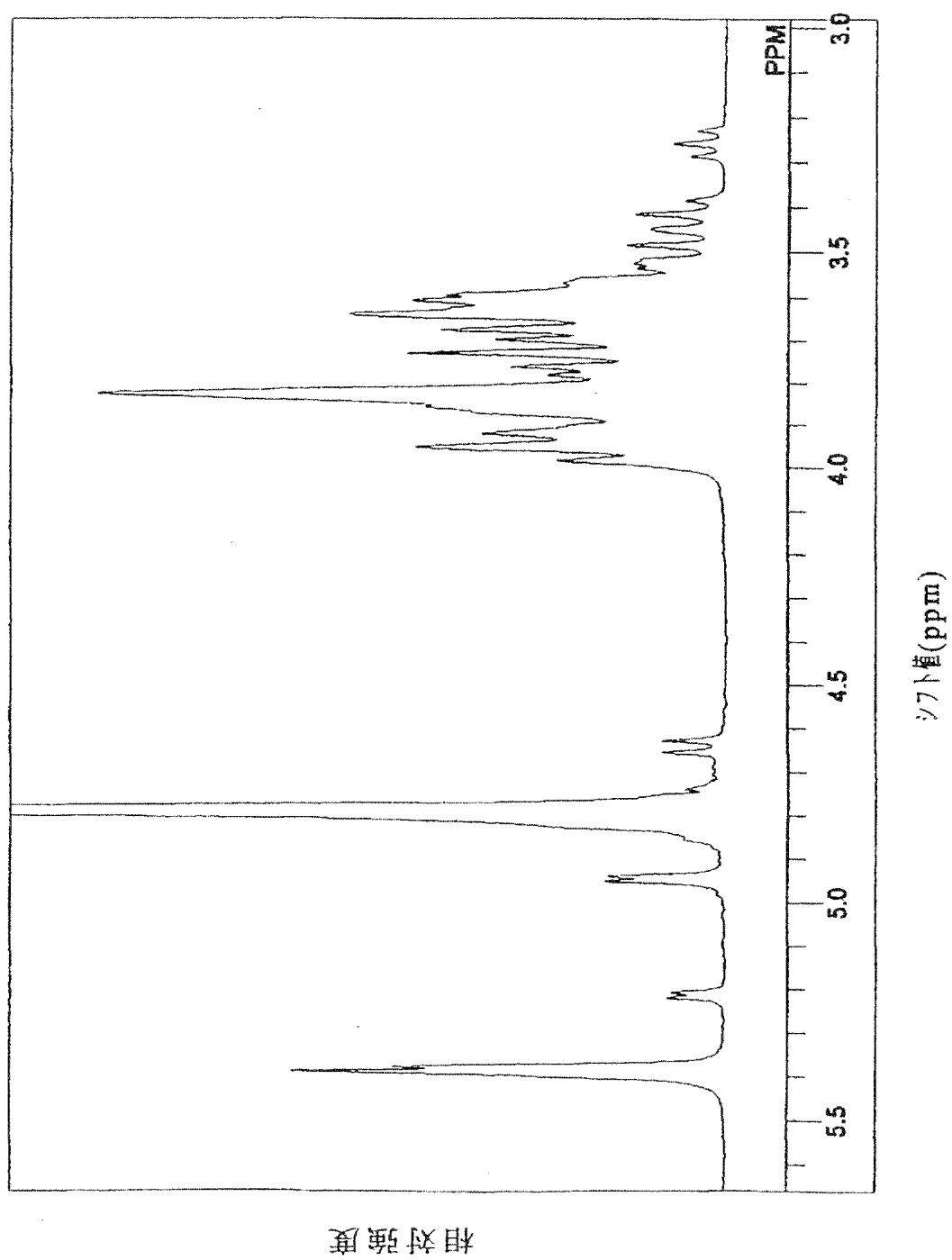
21/33

第 21 図

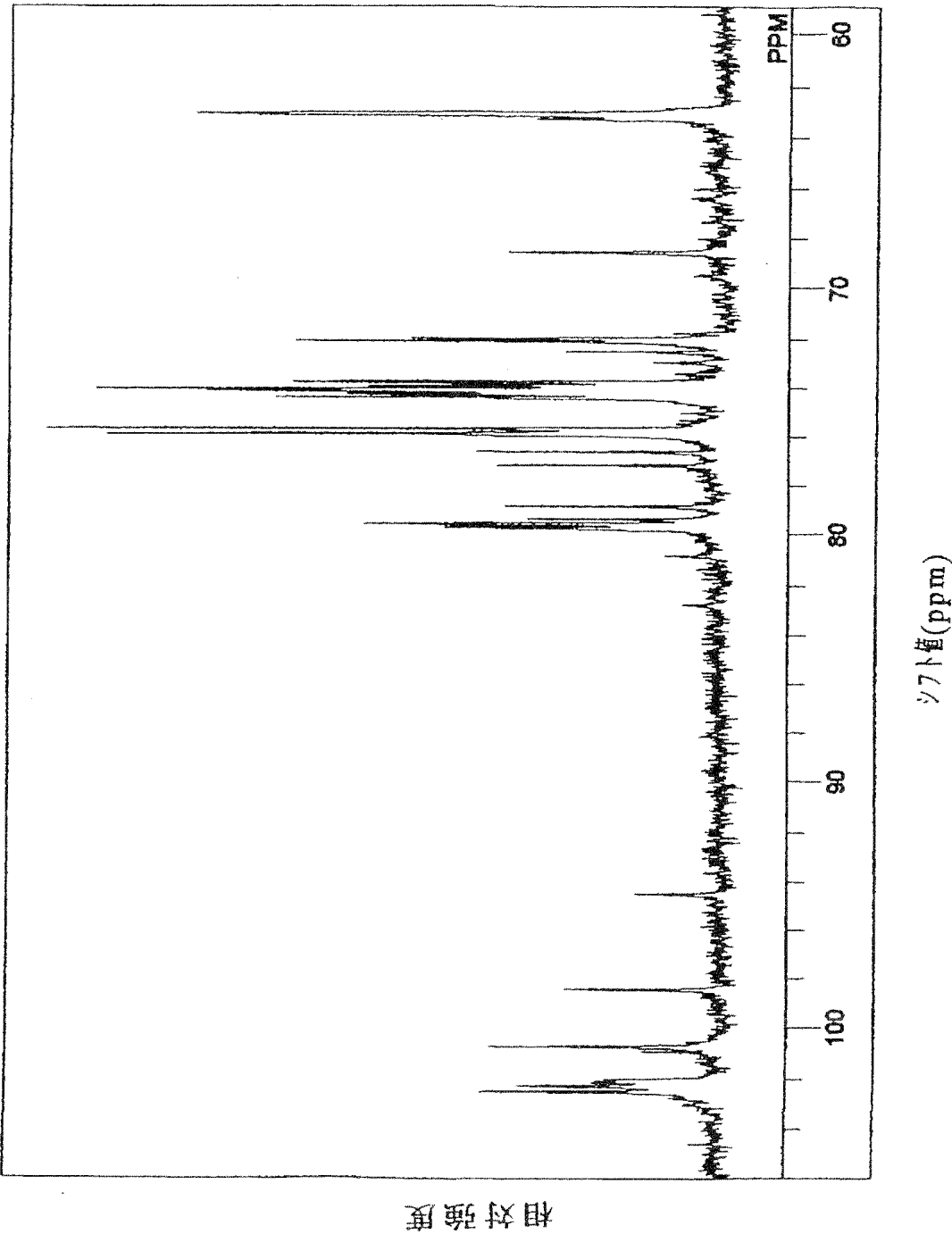


22/38

第 22 図

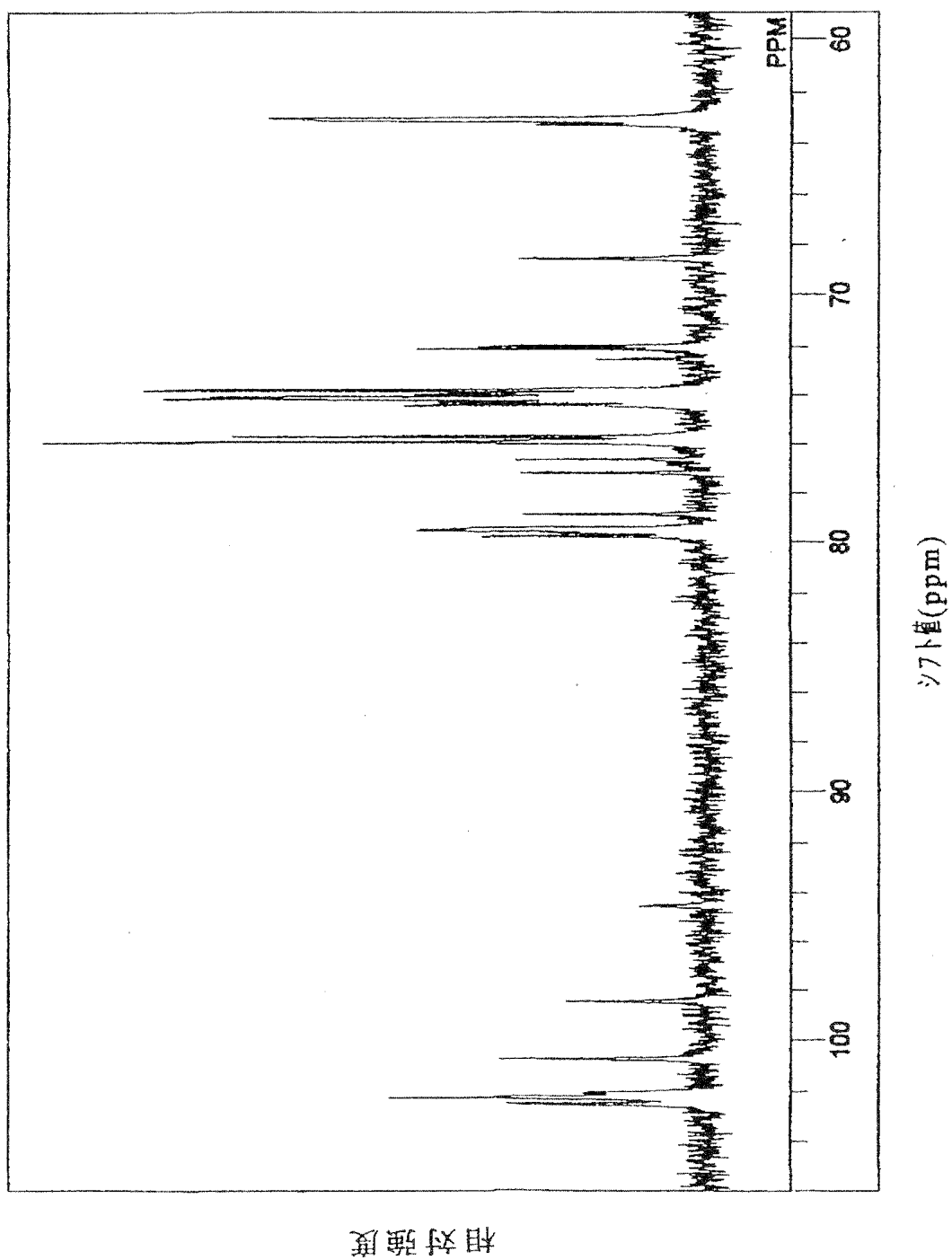


第 23 図



24/33

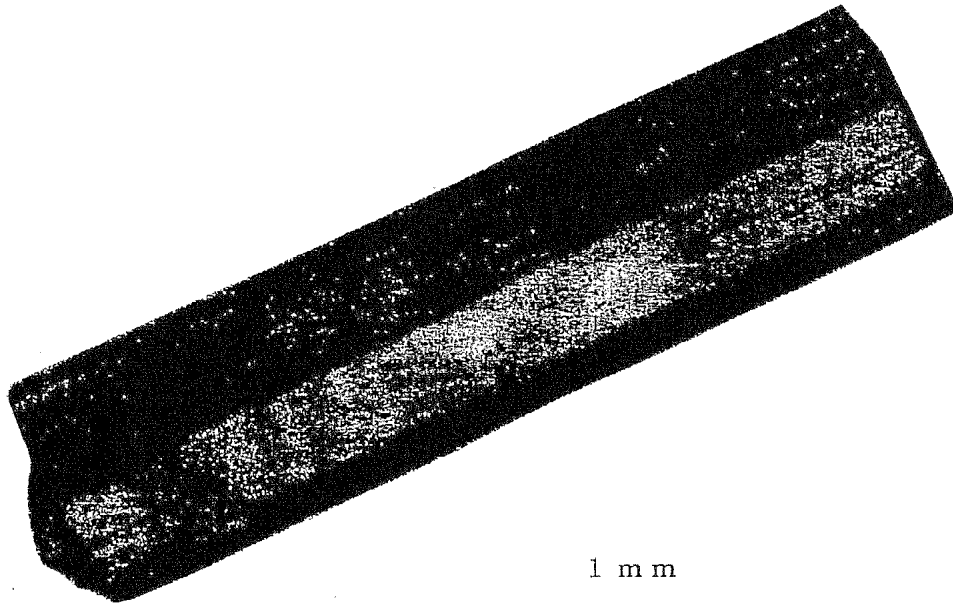
## 第 24 図





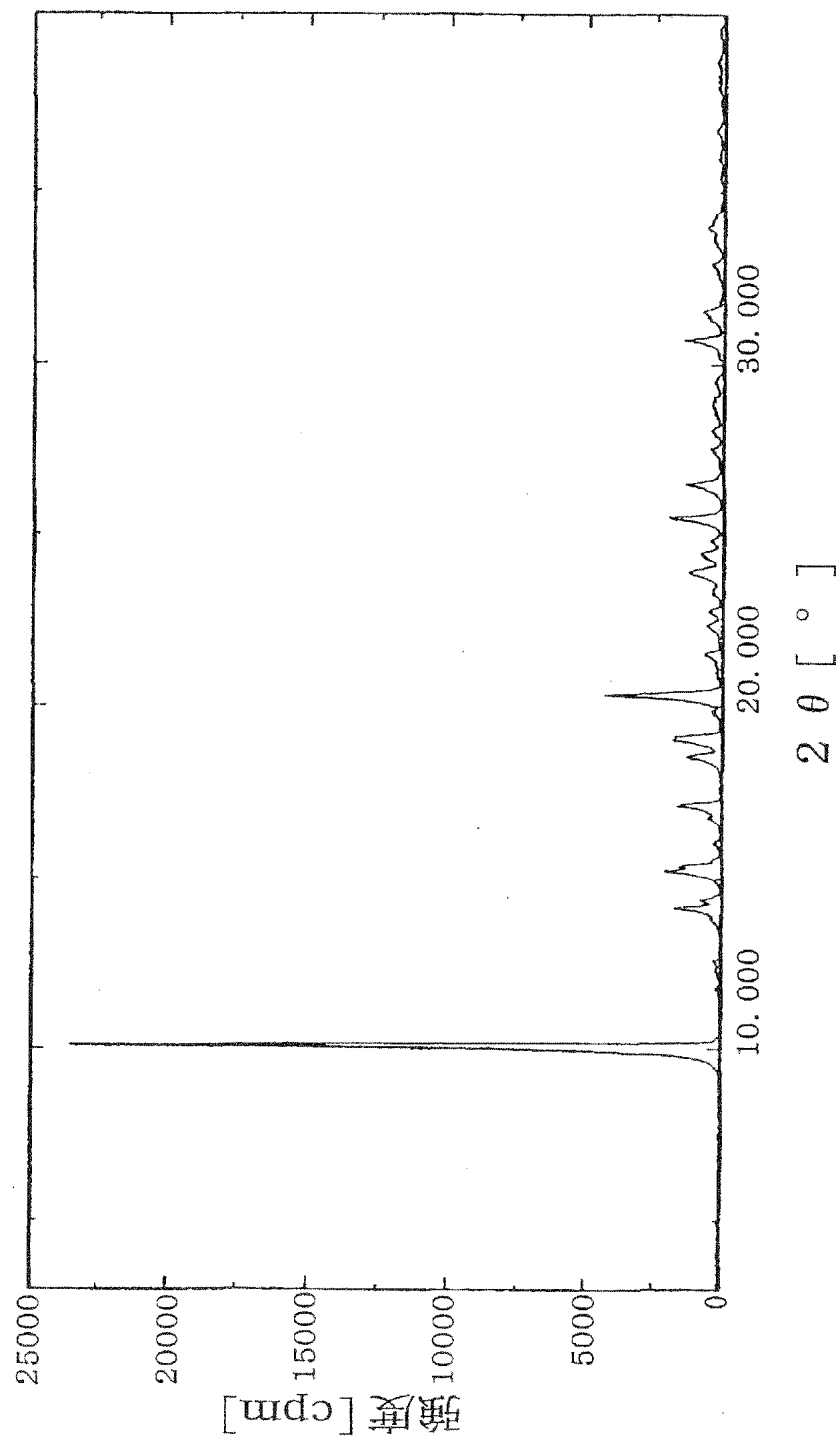
25/33

第 25 図



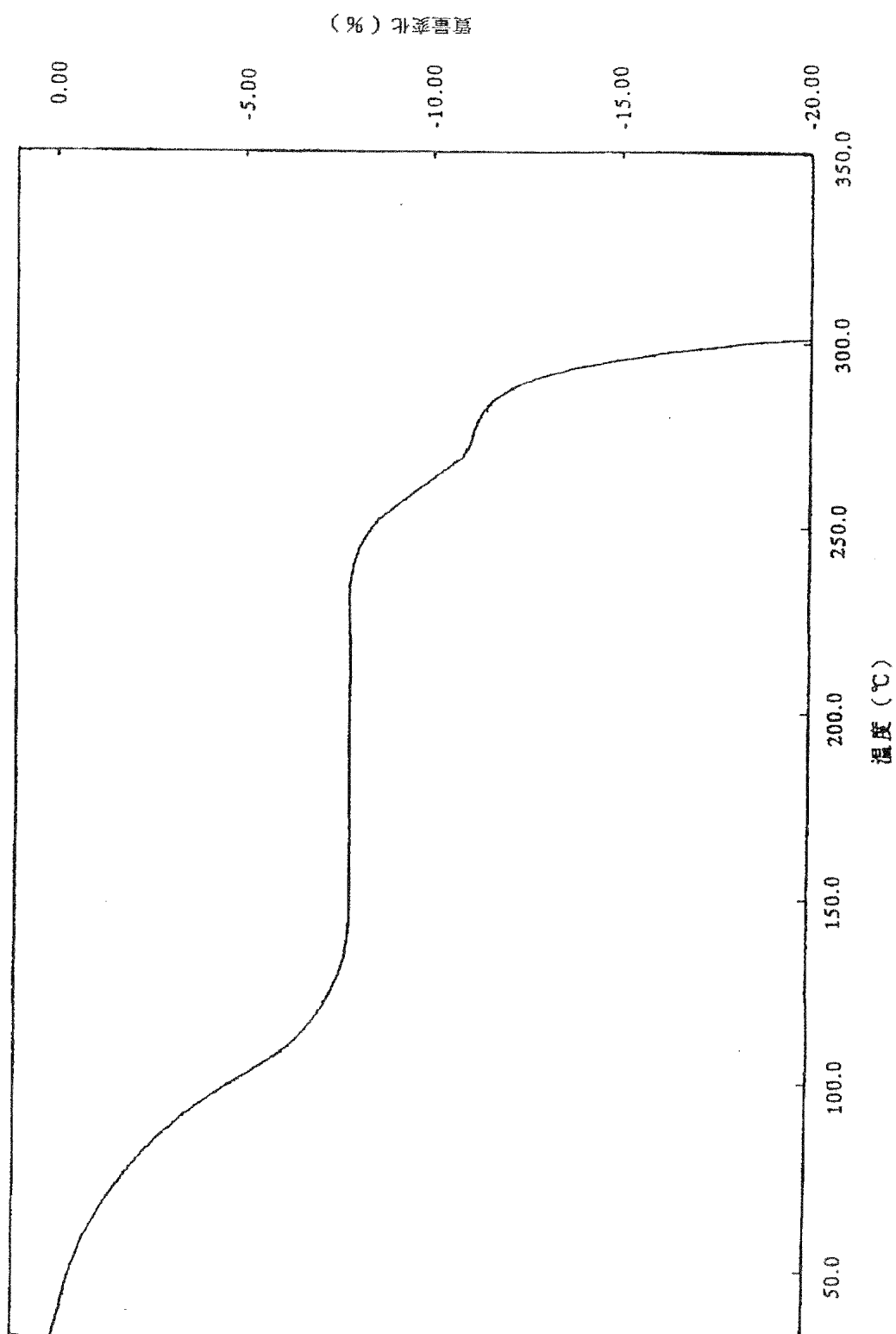
26/33

第 26 図



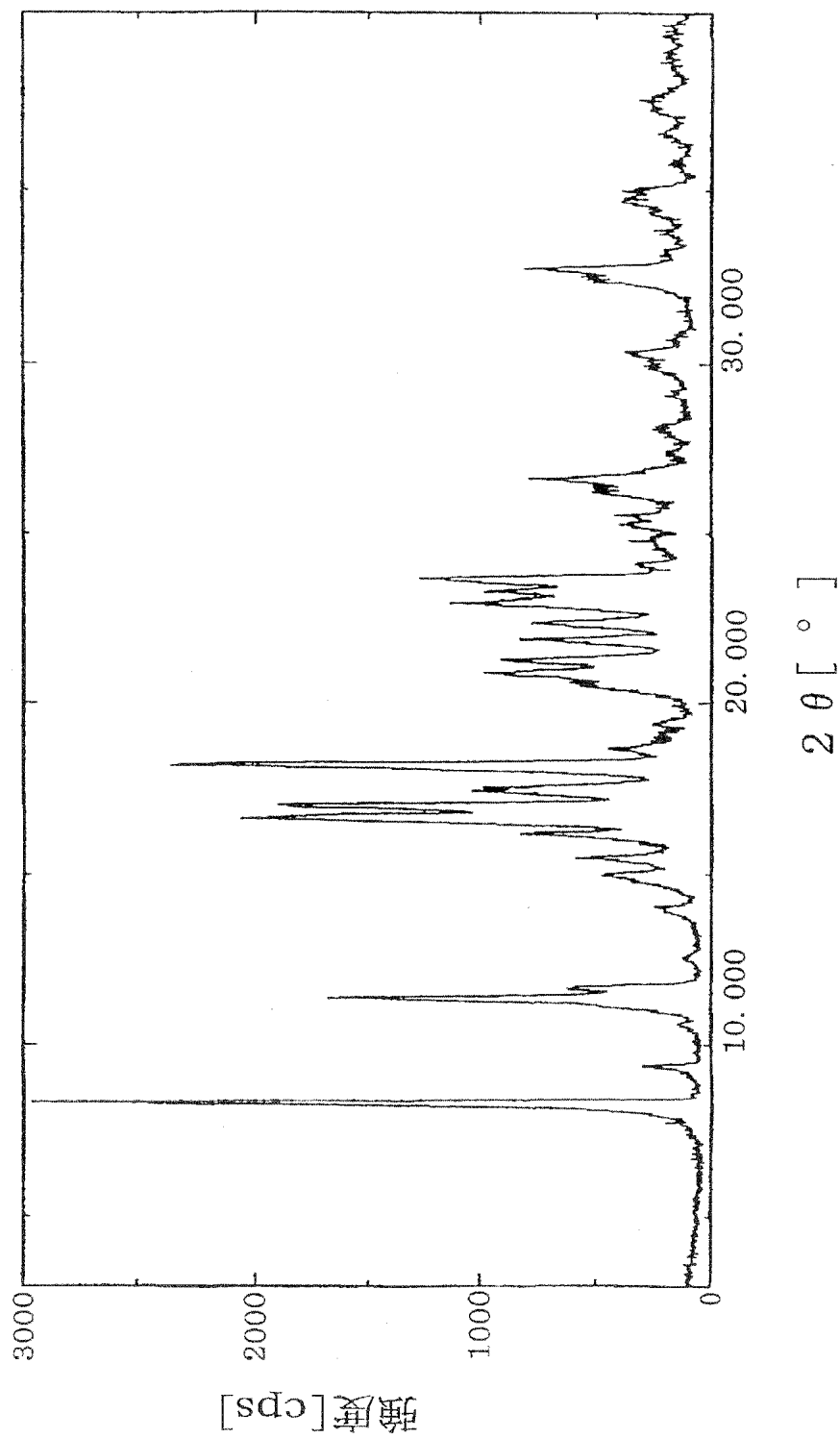
27/33

第 2 7 図



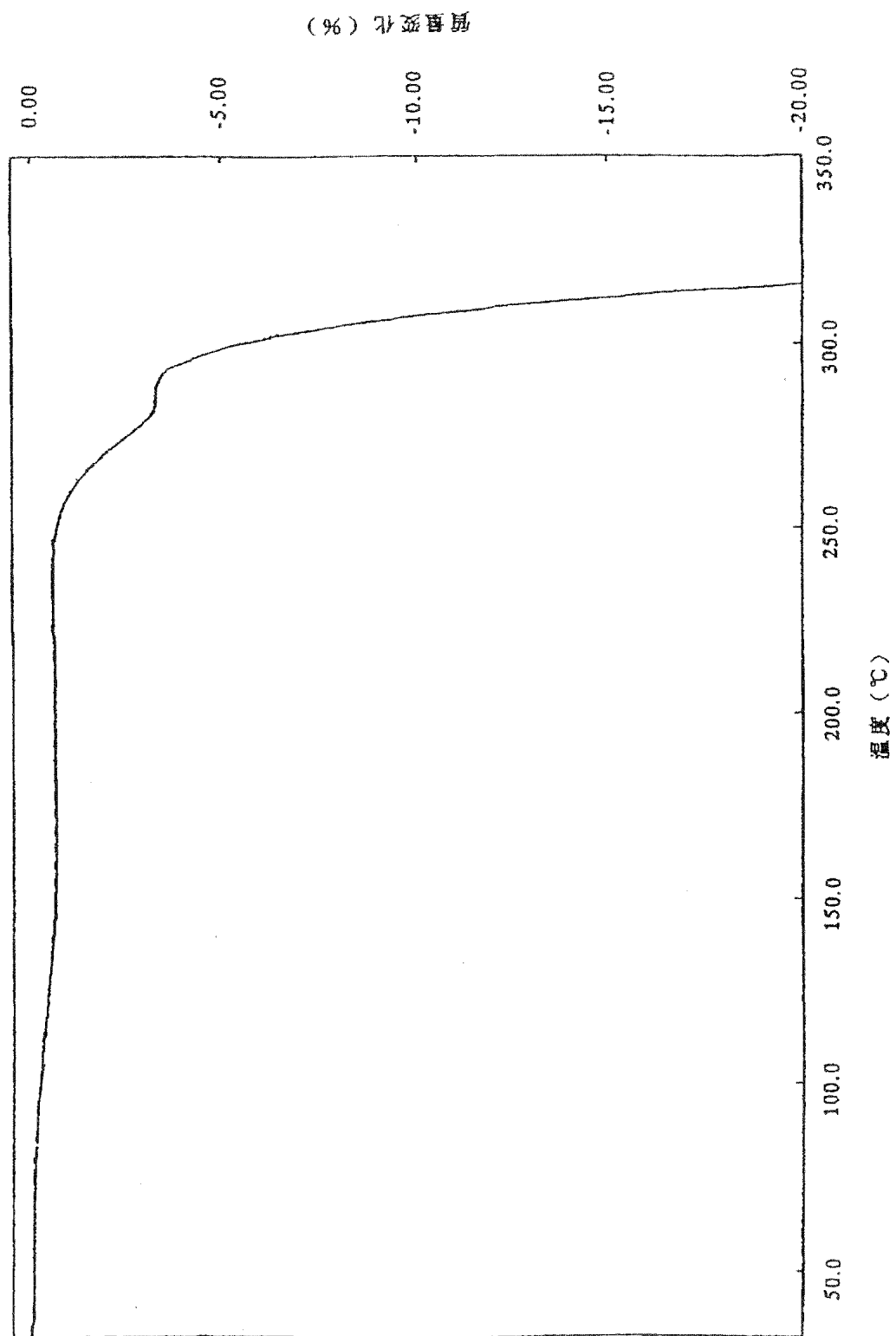
28/33

第 28 図



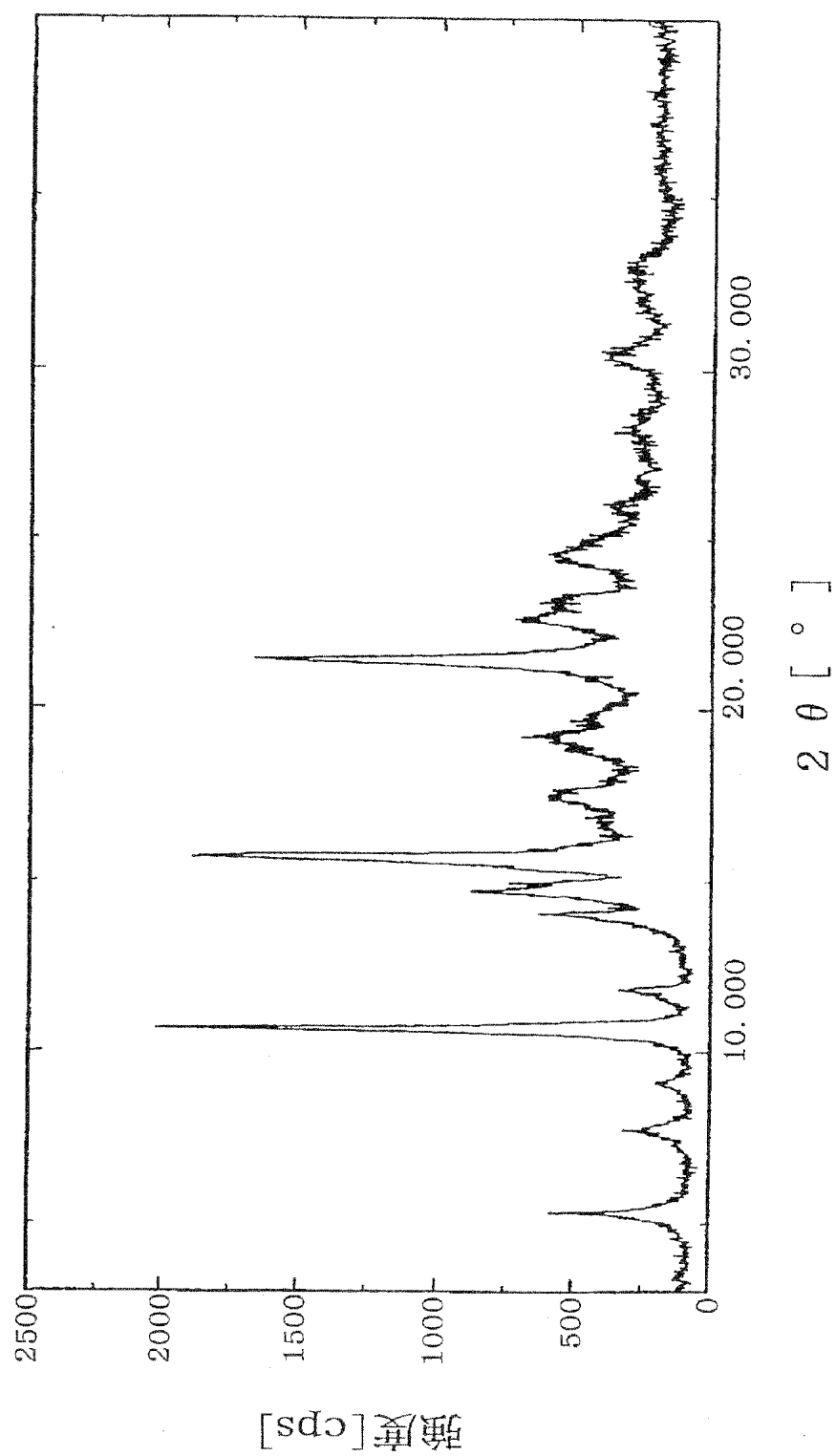
29/33

## 第 29 图



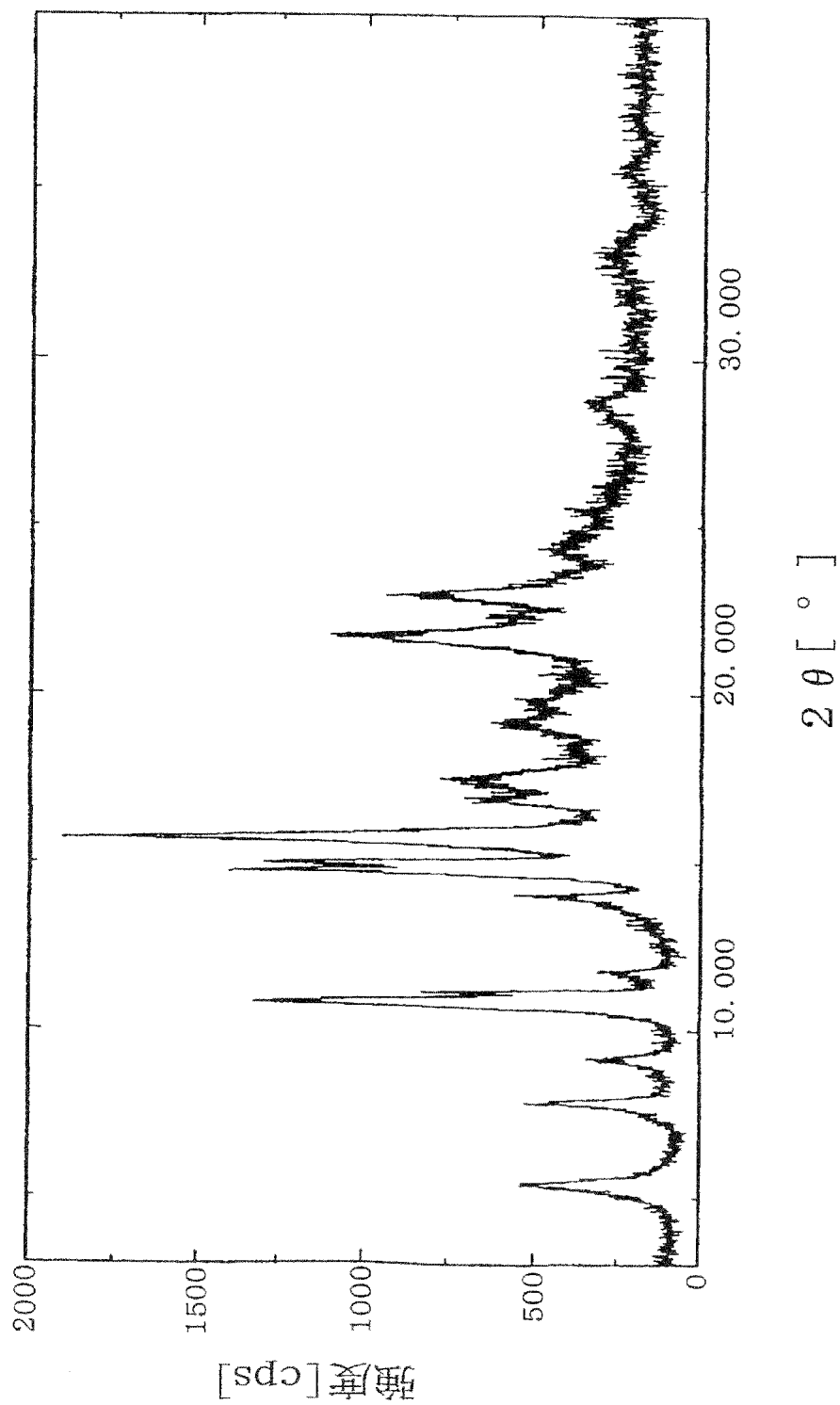
30/33

第 30 図



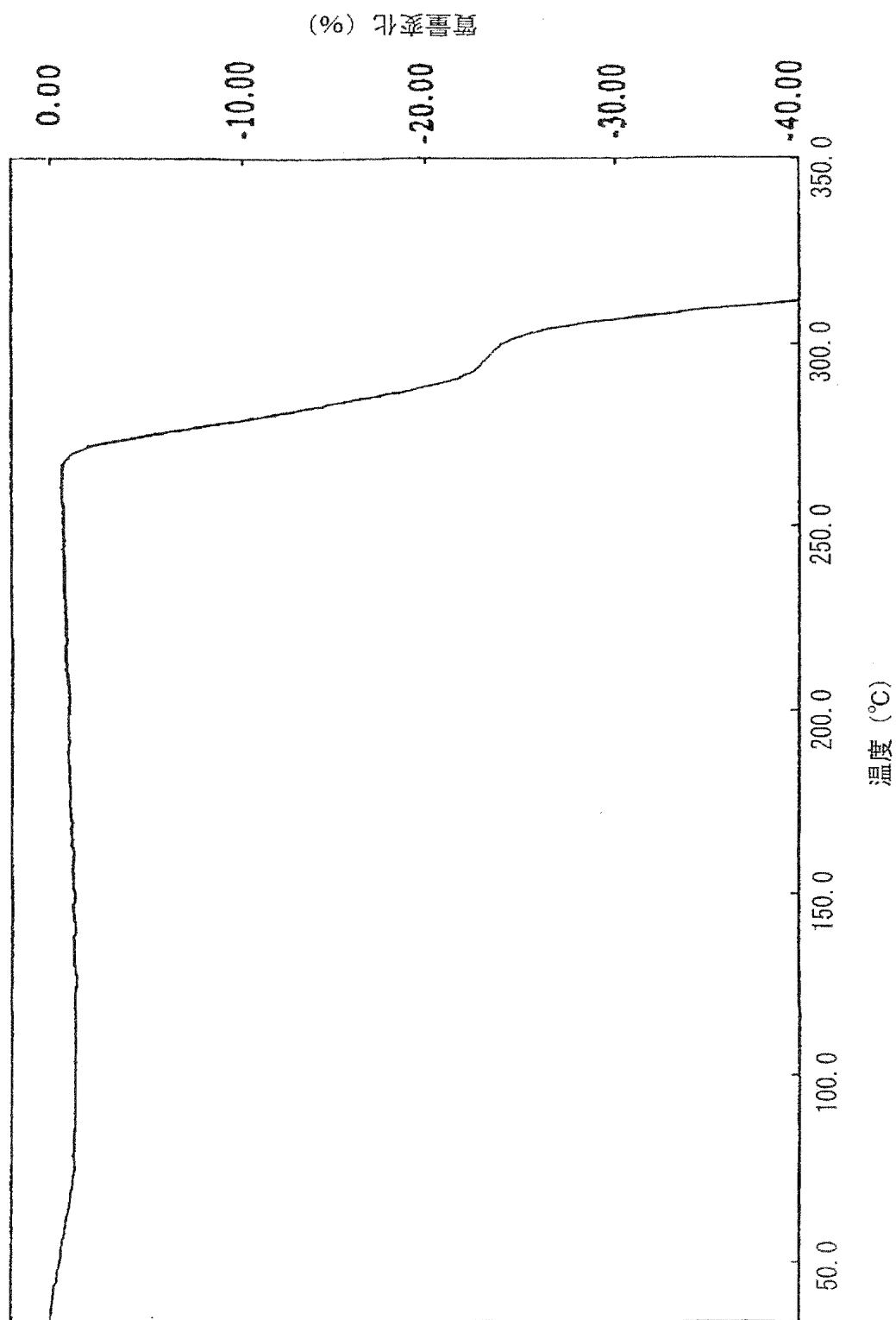
31/33

第 31 図



32/33

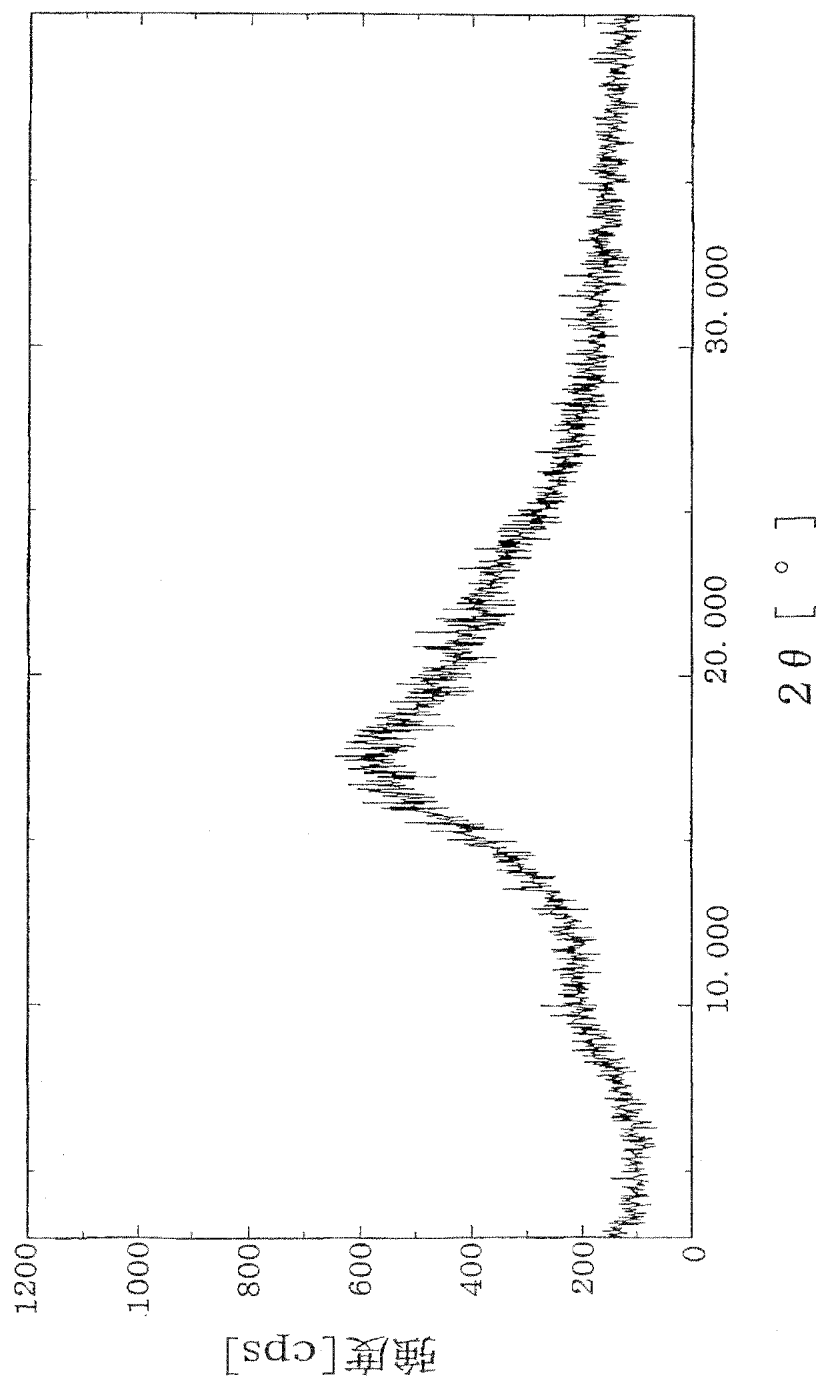
## 第 3 2 図





33/33

第 33 図



1/3

## SEQUENCE LISTING

<110> Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo

<120> Desiccant, Dehydration Therewith, And Dehydrated Product  
Obtainable Thereby

<130> WO880

<150> JP 010,991/01

<151> 2001-1-19

<160> 10

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> *Bacillus globisporus*

<400> 1

Tyr Val Ser Ser Leu Gly Asn Leu Ile

1

5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> *Bacillus globisporus*

<400> 2

Ile Asp Gly Val Tyr His Ala Pro Asn Gly

1

5

10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> *Bacillus globisporus*

2/3

&lt;400&gt; 3

Ile Asp Gly Val Tyr His Ala Pro Tyr Gly

1 5 10

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 4

Ile Asp Gly Val Tyr His Ala Pro

1 5

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 5

Asp Ala Ser Ala Asn Val Thr Thr

1 5

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 6

Trp Ser Leu Gly Phe Met Asn Phe

1 5

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

3/3

&lt;400&gt; 7

Asn Tyr Thr Asp Ala Trp Met Phe

1

5

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 8

Gly Asn Glu Met Arg Asn Gln Tyr

1

5

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 9

Ile Thr Thr Trp Pro Ile Glu Ser

1

5

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 10

Trp Ala Phe Gly Leu Trp Met Ser

1

5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00288

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> B01J20/22, A23L3/42, C07H3/06, A61K47/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> B01J20/22, A23L3/42, C07H3/06, A61K47/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2002	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 8-134447 A (K.K. Fushimi Seiyakusho), 28 May, 1996 (28.05.96), Claims; Par. Nos. [0015] to [0048] (Family: none)	1-11
A	US 5026566 A (Quadrant Bioresources, Ltd.), 25 June, 1991 (25.06.91), Full text & WO 89/00012 A1 & EP 297887 A1 & JP 2-503864 A	1-11
A	US 4788237 A (ARCO Chemical Co.), 29 November, 1988 (29.11.88), Column 5, lines 40 to 50 & EP 272074 A2 & JP 63-222761 A	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
10 April, 2002 (10.04.02)

Date of mailing of the international search report  
23 April, 2002 (23.04.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00288

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5175279 A (Hakuto Co., Ltd.; Agency of Industrial Science and Technology), 29 December, 1992 (29.12.92), Full text & EP 379999 A1                      & JP 2-291292 A	1-11

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> B01J20/22, A23L3/42, C07H3/06, A61K47/26

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> B01J20/22, A23L3/42, C07H3/06, A61K47/26

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1926-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2002年
日本国登録実用新案公報	1994-2002年
日本国実用新案登録公報	1996-2002年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 8-134447 A (株式会社伏見製薬所) 1996. 05. 28, 【特許請求の範囲】, 段落【0015】～【0048】 (ファミリーなし)	1～11
A	US 5026566 A (Quadrant Bioresources, Limited) 1991. 06. 25, 全文 & WO 89/00012 A1 & EP 297887 A1 & JP 2-503864 A	1～11
A	US 4788237 A (ARCO Chemical Company) 1988. 11. 29, 第5欄第40～50行 & EP 272074 A	1～11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.04.02

国際調査報告の発送日

23.04.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新居田 知生



4Q

8618

電話番号 03-3581-1101 内線 6424

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	2 & JP 63-222761 A  US 5175279 A (Hakuto Co.,Ltd;Agency of Industrial Science and Technology) 1992. 12. 29, 全文 & EP 379999 A1 & JP 2-291292 A	1~11